

ADEME



Agence de l'Environnement  
et de la Maîtrise de l'Energie



cirad

cerege



Aix\*Marseille  
université

# UNIVERSITE D'AIX-MARSEILLE

## Ecole doctorale Sciences de l'Environnement

Thèse présentée pour obtenir le grade universitaire de docteur

Discipline : Géosciences

Préparée au sein du: CEREGE et CIRAD

Maureen LE BARS

Devenir du zinc des produits résiduaire organiques après  
méthanisation et recyclage agricole : rôle des nanoparticules de  
sulfure de zinc

Soutenue le 25/02/2019 devant le jury :

Marie-Pierre ISAURE	Maître de conférence, UPPA	Rapportrice
Emmanuel GUILLON	Professeur, URCA	Rapporteur
Éric VAN HULLEBUSCH	Professeur, IPGP	Examineur
Corinne CHANEAC	Professeur, UPMC	Examinatrice
Samuel LEGROS	Chargé de recherche, CIRAD	Directeur de thèse
Clément LEVARD	Chargé de recherche, CNRS	Directeur de thèse
Emmanuel DOELSCH	Directeur de recherche, CIRAD	Directeur de thèse

Numéro national de thèse/suffixe local : 2019AIXM0034/004ED251



# Remerciements

*Ces 3 années ont été très riches, épanouissantes personnellement et professionnellement, et je tiens à remercier sincèrement tous ceux qui ont contribué au fait que ma thèse se passe si bien.*

*Premièrement, un grand merci aux membres du jury d'avoir accepté d'évaluer mon travail de thèse. Merci aux rapporteurs Marie-Pierre Isaure et Emmanuel Guillon, merci aux examinateurs Corinne Chanéac et Eric Van Hullebusch d'avoir lu avec attention ma thèse, puis pour les discussions intéressantes pendant la soutenance.*

*Merci à l'ADEME d'avoir financé mes trois années de thèse. Merci Valérie Pineau pour le suivi administratif. Merci à mon ingénieur référente, Fabienne Muller, d'avoir suivi mon travail.*

*Un immense merci à mes trois encadrants de thèse !! C'est en très grande partie grâce à vous si la thèse fût si agréable, grâce à votre bienveillance, votre humour et vos encouragements ! Merci pour toutes les connaissances scientifiques que vous m'avez transmises ainsi que pour votre confiance. Samuel, merci en particulier pour toutes les ondes positives que tu m'as envoyées pendant les runs synchrotron, lors de tes passages au cerege, mais aussi tout au long de la thèse depuis le Sénégal. Merci d'avoir suivi la thèse depuis si loin, tu étais au top ! Clément, chef et voisin de bureau, merci d'avoir été si présent au quotidien, de m'avoir initié à la chimie et pour tous tes schémas explicatifs de diffusion et d'absorption des rayons X toujours très pédagogiques ! Emmanuel, merci d'avoir toujours répondu à mes questions, pour tes conseils stratégiques et pour ton investissement dans le suivi de tous les aspects de la thèse malgré ton emploi du temps ! J'ai beaucoup apprécié faire équipe avec vous trois et je souhaite à tous les doctorants d'avoir des encadrants comme vous !*

*L'équipe Environnement Durable du Cerege a également beaucoup contribué au bon déroulement de ma thèse ! Merci à Jérôme Rose, d'avoir apporté un regard extérieur sur l'ensemble de mes résultats, ton expertise m'a toujours permis de prendre du recul et d'améliorer considérablement la discussion des résultats. Merci d'être venu donner un coup de main bien appréciable au synchrotron à Stanford, et pour ta bonne humeur communicative ! Merci à mon prof de physique, Vlad ! Ces*

moments de travail (beaucoup d'effort sur une courte durée) m'ont beaucoup aidée ! Merci également d'être toujours venu à la rescousse pour bricoler ! Merci Jean-Paul pour ta générosité et de m'avoir aidée au labo un nombre incalculable de fois ! Merci Daniel pour ton investissement très appréciable pour le traitement et les réflexions sur les données DRX ! Merci Jérôme Labille pour ta disponibilité et pour les discussions instructives sur les argiles. Merci Blanche d'avoir participé à quelques-unes de mes réunions de thèse et d'y avoir apporté une touche de bio ! Merci aussi pour les petits papotages de voisines de bureau ! Merci à Bernard pour les nombreuses analyses ICP et pour ta motivation dans le développement de la méthode d'analyse des rapports isotopiques. Merci à Sylvie pour les nombreuses commandes et envois de colis, toujours dans la bonne humeur !! Merci à mes co-bureaux, Clément, Marie-Charlotte, Marie-Laure, Arnaud. Merci à Fabienne pour les tandems français-allemand rigolos et réguliers et surtout les nombreuses fondues suisses, y compris en juin en bord de mer ! Merci à Nith pour ton soutien pendant toute cette dernière année de thèse et pour ton aide en microscopie ! Merci à Danielle, Anne, Cyprien de m'avoir accueillie dans les labos de chimie ! Kristin, merci pour les nombreux tandems, j'en garde un très bon souvenir ! Merci au groupe des joggeurs de m'avoir motivée pour me défouler dans les collines de l'arbois ! Perrine, fidèle coach sportive, merci également pour toutes les petites attentions gourmandes, tes conseils et pour ta solidarité féminine ! Merci aussi aux autres fidèles joggeuses motivées : Isabelle et Lorette. Merci à toutes les autres personnes de l'équipe pour votre aide, soutien et bonne humeur quotidienne : Mélanie, Camille, Armand, Jean-Do, Catherine, Vincent, Till, Luis, Jesus, Sophie, Zuzanna, Cédric, Julien. Vous allez me manquer et je vais regretter les nombreux social events !

Je suis également très reconnaissante envers les personnes de l'unité recyclage et risque pour leur accueil, ainsi que pour toutes les discussions enrichissantes que j'ai pu avoir avec vous. Un grand merci à Claire et Mélanie pour un investissement énorme dans les manips d'incubations de sol à Montpellier, que ce soit avant, pendant ou après. Merci pour votre gentillesse et accueil chaleureux à Montpellier. Merci à Brigitte pour ton accueil à Montpellier et d'avoir géré ces nombreux ordres de mission tout au long de la thèse ! Merci à Laure, Denis pour les coups de mains lors des manips. Merci à Marie pour tes conseils DGT et les nombreuses fois où tu m'as aidée ! Merci à Mathieu pour les discussions que nous avons eues, ton regard a toujours fait progresser mon travail ! Merci également à Jean-Marie, Frédéric, Tom, Angel, Laurent, Céline pour les discussions que nous avons pu avoir.

Un grand merci à mon prof d'isotopie ! Abel, ça a été un plaisir de travailler avec toi. Merci beaucoup pour ta disponibilité, ta patience et surtout ton enthousiasme pour le développement de la manip de traçage de nano-ZnS. Merci à Alejandro, ton aide a été très précieuse pour l'analyse des données PDF. Merci pour ta disponibilité à Grenoble, par mail et même à Boston. J'espère que nous aurons l'occasion de nous recroiser et de parler PDF ! Merci aux membres de mon comité de pilotage de thèse, Catherine Santaella, Alexandre Gélabert et Éric Van Hullebusch d'être venus à Aix



*pour apporter votre regard extérieur et de nombreux bons conseils à la fin de ma première année de thèse. Merci aux membres du projet Digestate, et particulièrement à Dominique Patureau, Nicolas Sertillanges, Sabine Houot pour vos conseils et discussions autour des PRO !*

*Merci à toutes les personnes qui ont pris le temps d'analyser des nano-ZnS ! Merci à Anthoine Thill d'avoir passé les nano-ZnS en SAXS et pour l'interprétation des signaux. Merci à Nathan Bossa pour l'analyse XPS ! Merci à Bénédicte Prelot pour les analyses BET des nano-ZnS. Merci à Olivier Grauby, Nithavong Cam, Andréa Campos, Ralf Käge pour leur patience pour imager des nano-ZnS au MET ou MEB. Merci à Elena Bazarkina de m'avoir fourni de la sphalérite. Merci à Olivier Proux pour le renfort lors du run à Stanford et pour ta bonne humeur ! Merci à tous les local contacts des lignes synchrotron que j'ai eu la chance d'utiliser. Merci à Isabelle Kieffer (ESRF), Mauro Rovezzi (ESRF), Ryan Davis (SSRL), Olaf Borkiewicz (APS), Luca Olivi (Elettra) pour le temps passé aux réglages des lignes et pour votre aide ! Merci à tous les stagiaires qui ont bien fait avancer la thèse ! Merci à Audrey, Laura, Carole et Jean.*

*Un immense merci à mes frères et sœurs du Cerege ! Gabrielle, merci de m'avoir prise sous ton aile au début de ma thèse ! C'était un vrai plaisir de travailler avec toi mais également d'être ton amie. Merci aussi pour tous les conseils qui m'ont inspiré tout au long de ma thèse ! Julie, merci pour tout, merci de m'avoir adoptée comme petite sœur, de m'avoir donné de bons conseils pour toutes les péripéties de la thèse et de m'avoir enseigné le second degré. Merci aux poulettes Eléonore, Manon, Chloé, Eugénie, à Wuhib, Thiago, Valenti, Riccardo, Seb. J'ai toujours pu compter sur vous et cette amitié a été très précieuse pendant la thèse ! ça aurait clairement été beaucoup plus difficile sans vous ! Un grand merci à Ross, Jonathan, Aladin, Hamed, Pierre, William pour tous les bons moments que j'ai passé avec vous à Marseille, Aix ou autour d'un café au Cerege ! Merci aussi à ceux que j'ai rencontré et vu plus ponctuellement (Astrid, Morgane, Naresh, Vincent) pour les discussions motivantes.*

*Merci aux copains extérieurs de m'avoir permis de déconnecter de temps en temps et pour votre compréhension ! Merci aux copains de Marseille (Diane, Juliette, Sue, PY, Marion, Albanne, Paulo – coloc au top ! -), les copains de l'UTC (Charlie, Parrain, Elise, Marie, Adeline, Gaëtan, Rémi, Fred, Emilie, Juju...), du lycée ou d'encore plus loin (Ophé, Naj, Salomé, Pauline, Tad, Camille, Hadrien...), la guinguette, la famille Browne et tous ceux que je n'ai pas cités ! Merci pour votre soutien jusqu'au bout !*

*Merci à ma famille qui m'a instruit toutes les valeurs que je porte aujourd'hui et qui m'a toujours soutenue dans mes choix et surtout pendant toute la thèse. Merci d'être venus le jour de la soutenance, j'étais contente de pouvoir partager ça avec vous. Et enfin, merci infiniment à Patrick, tu as été un vrai pilier ! Merci pour ta compréhension, ta patience et ton soutien quotidiens qui ont été très précieux du début à la fin.*

*Maureen*



# Sommaire général

<b>Remerciements .....</b>	<b>3</b>
<b>Sommaire général .....</b>	<b>7</b>
<b>Préambule .....</b>	<b>15</b>
<b>Chapitre 1 - Nécessité de connaître le devenir du zinc des produits résiduaire organiques après recyclage en passant par l'étude des nano-ZnS : état de l'art et objectifs .....</b>	<b>17</b>
Sommaire.....	19
1. Problématique du zinc dans les produits résiduaire organiques (PRO)s	21
1.1. Définitions .....	21
1.2. Production et gestion des déchets organiques: exemple de la France .	23
1.3. Traitements appliqués aux PRO: compostage et méthanisation .....	24
1.4. Epannage des digestats .....	26
1.5. Zinc dans les PRO .....	28
1.6. Règlementation dans le cadre de l'épannage des PRO .....	30
2. Spéciation du zinc dans les PRO: information cruciale pour établir le risque .....	32
2.1. Toxicité du zinc.....	32
2.2. Spéciation et (bio)disponibilité: intérêt pour évaluer le risque .....	35
2.2.1. Définitions .....	35
2.2.2. Spéciation du Zn : influence sur la (bio)disponibilité et la toxicité .	37
2.3. Mise en évidence de ZnS dans les digestats.....	38
2.4. Changement de spéciation durant le traitement aérobie : mise en évidence de la réactivité des ZnS formés dans les PRO .....	41
2.4.1. Spéciation du Zn dans les PRO traités par voie aérobie .....	41
2.4.2. Transformation des ZnS : cinétique rapide .....	42
3. Formation des nano-ZnS .....	43
3.1. Généralités : Nucléation et croissance cristalline .....	44
3.2. Formation des nano-ZnS .....	46

3.2.1. Précipitation abiotique.....	46
3.2.2. Précipitation biogénique .....	48
3.3. Facteurs pouvant influencer les propriétés structurales des nano-ZnS lors de leur formation .....	49
3.3.1. Influence des microorganismes.....	49
3.3.2. Molécules organiques .....	50
<b>4. Facteurs pouvant influencer la réactivité des nano-ZnS.....</b>	<b>54</b>
4.1. Facteurs intrinsèques .....	55
4.1.1. Taille .....	55
4.1.2. Désordre structural .....	56
4.2. Facteurs extrinsèques.....	59
4.2.1. Oxydation abiotique des ZnS .....	59
4.2.2. Microorganismes .....	60
4.2.3. Plantes.....	61
4.2.4. Ligands du sol.....	61
<b>5. Objectifs .....</b>	<b>62</b>
5.1. Effet de la méthanisation et du compostage sur la spéciation du Zn dans les PRO.....	62
5.2. Influence du milieu PRO sur la réactivité des nano-ZnS formées .....	63
5.3. Influence des paramètres extrinsèques sur le devenir des nano-ZnS dans le sol.....	64
Références.....	65

## **Chapitre 2 - Influence des traitements sur la spéciation du zinc dans les PRO : une étude globale .....73**

Sommaire.....	75
Drastic change in zinc speciation during anaerobic digestion and composting: instability of nano-sized zinc sulfide .....	77
Abstract .....	78
Introduction.....	78
<b>1. Experimental section.....</b>	<b>80</b>
1.1. Preparation of organic waste samples .....	80
1.2. Physical-chemical analyses.....	82
1.3. Preparation of samples and reference compounds for EXAFS analysis.....	82
1.4. EXAFS spectra acquisition and analysis .....	83

<b>2. Results and Discussion .....</b>	<b>84</b>
2.1. Changes in physical-chemical characteristics of OWs during treatment .....	84
2.1.1. Dry Matter, organic carbon and pH.....	86
2.1.2. Zn concentration .....	86
2.2. Change in Zn speciation during treatment.....	87
2.2.1. Zn speciation in raw OWs.....	90
2.2.2. Zn speciation in digestates.....	91
2.2.3. Zn speciation in the liquid and solid fractions of the digestate .....	91
2.2.4. Zn speciation in composts.....	91
2.3. The nano-size of ZnS explains its ephemeral nature .....	92
2.4. Environmental implications.....	94
Associated content .....	95
Author information.....	95
Acknowledgements .....	95
References.....	96
Annexe: Supporting information.....	100
SI-1: Influence of freeze drying process on Zn K-edge EXAFS spectrum.....	100
SI-2: Influence of aging of freeze-dried sample on Zn speciation .....	100
SI-3: Reference compounds for linear combination fitting .....	103
SI-4: Detailed results of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy linear combination fitting .....	105
References.....	112

### **Chapitre 3 - Propriétés structurales des nano-ZnS : effet des molécules organiques .....**

Sommaire.....	115
Introduction.....	117
<b>1. Matériel et méthodes .....</b>	<b>118</b>
1.1. Synthèse de nano-ZnS .....	118
1.1.1. Nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques (MO) .....	121
1.1.2. Expérience “in situ” : influence de la cystéine sur la contraction des particules .....	122
1.1.3. Micro-ZnS pour expérience de dissolution .....	122

1.2. Méthodes de caractérisation .....	122
1.2.1. Microscopie électronique à transmission .....	122
1.2.2. Diffraction des rayons X et Diffusion totale des rayons X aux grands angles.....	123
1.2.3. Spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS) .....	123
1.2.4. Détermination des paramètres de structure des nano-ZnS.....	124
1.2.4.1. Taille MET.....	124
1.2.4.2. Taille minimale (DRX) .....	124
1.2.4.3. Taille maximale (PDF) .....	125
1.2.4.4. Taille moyenne (PDF) .....	125
1.2.4.5. Taille EXAFS.....	125
1.2.4.6. Détermination de la contraction du réseau cristallin.....	126
1.2.4.7. Analyse statistique .....	126
1.2.5. BET.....	126
1.3. Dissolution des nano-ZnS .....	127
<b>2. Résultats et discussion .....</b>	<b>127</b>
2.1. Influence de la taille sur le désordre structural .....	127
2.1.1. Caractérisation multi-échelle: taille des nano-ZnS .....	127
2.1.2. Relation entre taille et contraction du réseau cristallin des nano-ZnS .....	132
2.1.3. Discussion .....	134
2.2. Influence de la matière organique sur la structure des nano-ZnS.....	137
2.2.1. Influence du type de molécule organique .....	137
2.2.1.1. Effet sur la taille.....	138
2.2.1.2. Effet sur la contraction du réseau cristallin .....	139
2.2.2. Interaction avec le groupement thiol.....	141
2.2.2.1. L'effet de l'encombrement stérique de molécule thiolée sur la taille et la contraction du réseau cristallin .....	141
2.2.2.2. Influence de la cystéine sur la contraction du réseau cristallin pour une particule de taille donnée .....	144
2.2.2.3. Effet de la concentration en cystéine sur la taille et la contraction du réseau cristallin .....	145
2.2.3. Discussion .....	147

2.2.3.1. Influence du groupement thiol sur la taille des nano-ZnS ..	147
2.2.3.2. Influence des différentes molécules organiques sur la contraction du réseau cristallin .....	150
2.3. Influence de la taille et de la contrainte sur la cinétique de dissolution des nano-ZnS.....	152
2.3.1. Caractérisation des 3 particules .....	152
2.3.1.1. MET .....	152
2.3.1.2. Taille des cristallites .....	154
2.3.1.3. Contraction du réseau cristallin.....	155
2.3.1.4. Surface spécifique .....	156
2.3.2. Cinétique dissolution des 3 particules.....	156
Conclusion .....	159
Références .....	161
Annexes .....	163
Résultats de la caractérisation des nano-ZnS .....	163
Calcul du recouvrement des nano-ZnS par les molécules de cystéine .....	167
<b>Chapitre 4 - Devenir des nano-ZnS dans le sol .....</b>	<b>171</b>
Sommaire.....	173
Introduction.....	175
Partie 1 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à court-terme et à l'échelle du microcosme: influence des caractéristiques du sol .....	177
1. Matériel et méthodes .....	177
1.1. Synthèse des NPs .....	177
1.2. Sols.....	178
1.3. Incubation sol + nano- <sup>68</sup> ZnS en conditions contrôlées .....	180
1.4. Dispositif DGT (Diffusive Gradient in Thin Film) .....	181
1.5. Dosage du Zn issu des nano- <sup>68</sup> ZnS .....	182
1.6. Analyse statistique .....	183
2. Résultats et discussion .....	183
2.1. Activité bactérienne et pH.....	183
2.2. Labilité du Zn issu de la dissolution des nano- <sup>68</sup> ZnS .....	187
References .....	195
Partie 2 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à long terme et à l'échelle de la parcelle dans un sol argileux .....	197

Abstract .....	198
Introduction.....	199
1. Materials and methods .....	200
1.1. Field experiment and soil characterization .....	200
1.2. XRD analysis.....	201
1.3. Pig slurry characterization .....	201
1.4. Particle size fractionation of pig slurry .....	202
1.5. SEM-EDS analysis of the pig slurry .....	202
1.6. EXAFS .....	202
1.7. Synthesis and characterization of ZnS nanoparticles .....	203
2. Results and discussion.....	204
2.1. Zn enrichment within the soil due to PS application .....	204
2.2. Pig slurry .....	205
2.2.1. Co-location of Zn and S in sub-micron particle size.....	205
2.2.2. Nano-sized ZnS particles in PS .....	206
2.3. Soil .....	208
2.3.1. Clays dominate the soil mineralogy.....	208
2.3.2. ZnS was not detected in the amended soil .....	208
2.4. Environmental implication .....	212
Conclusion .....	213
Acknowledgements .....	213
Supporting information available.....	214
References .....	215
Supporting Information.....	219
Conclusion .....	220

## **Chapitre 5 - Conclusion générale et perspectives .....223**

1. Evolution de la spéciation du zinc dans les PRO selon le traitement appliqué (méthanisation, compostage) .....	226
2. Caractéristiques structurales des nano-ZnS en présence de molécules organiques.....	227
3. Devenir des nano-ZnS dans le sol.....	229
4. Implication environnementale : devenir du Zn des PRO après méthanisation et recyclage agricole .....	231
References .....	233



## **Chapitre 6 - Matériels et méthodes ..... 235**

Sommaire.....	237
1. Matériaux .....	239
1.1. Synthèse de nanoparticules .....	239
1.1.1. Protocole général .....	239
1.1.2. Synthèse en absence d'oxygène .....	239
1.1.3. Molécules organiques .....	240
1.1.4. Synthèse à partir de $^{68}\text{ZnO}$ pour incubation dans les sols.....	242
1.2. Description des 2 sols utilisés.....	242
1.3. Utilisation des matériaux dans la thèse.....	243
2. Etude de la stabilité des nano-ZnS .....	245
2.1. Dissolution des nano-ZnS en conditions contrôlées .....	245
2.2. Incubations en conditions contrôlées de sol + nano- $^{68}\text{ZnS}$ .....	246
2.2.1. Préparation des microcosmes .....	246
2.2.2. Diffusive Gradient in Thin Film (DGT) .....	247
2.2.3. Extraction de la solution de sol.....	248
2.2.4. Mesure activité microbienne .....	249
3. Méthodes de caractérisation .....	250
3.1. Caractérisation de la structure.....	250
3.1.1. Microscopie électronique à transmission .....	250
3.1.2. Diffraction des rayons X .....	250
3.1.2.1. Protocole pour nano-ZnS nues série 5, nano- $^{68}\text{ZnS}$ .....	251
3.1.2.2. Protocole pour nano-ZnS nues série 1, série 2, nano-ZnS avec MO	251
3.1.2.3. Calcul de la taille.....	251
3.1.3. Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) .....	253
3.1.3.1. Principe .....	253
3.1.3.2. Formalisme EXAFS .....	255
3.1.3.3. Mise en œuvre expérimentale .....	256
3.1.3.4. Traitement du signal .....	257
3.1.4. Diffusion totale des rayons X aux grands angles et analyse par fonction PDF.....	259
3.1.4.1. Principe .....	259

3.1.4.2. Mise en œuvre expérimentale .....	261
3.1.4.3. Traitement du signal .....	262
3.2. Caractérisation chimique.....	265
3.2.1. ICP-AES .....	265
3.2.2. ICP-MS .....	266
3.2.2.1. Principe et utilisation .....	266
3.2.2.2. Calcul de la concentration en Zn provenant des nano- <sup>68</sup> ZnS 266	
Références .....	271
<b>Liste des figures.....</b>	<b>273</b>
<b>Liste des tableaux.....</b>	<b>279</b>

# Préambule

Les Produits Résiduaire Organiques sont les matières résiduaire organiques qui peuvent être épandues en agriculture. Ils proviennent de l'agriculture (effluents d'élevage, résidus de culture), des activités urbaines (boues de station d'épuration, déchets verts) et des agro-industries. En raison de la production croissante de PRO liée à la croissance démographique, il est nécessaire de trouver des solutions durables à la gestion des PRO. Leur recyclage est une pratique courante et encouragée en raison de leur contenu en nutriments et en matière organique. Les PRO peuvent être recyclés bruts, ou après traitement tel que la méthanisation (digestion anaérobie) et/ou le compostage (digestion aérobie). Cependant, certaines informations manquent afin d'établir les risques environnementaux liés au choix du traitement et au recyclage des PRO. Le projet Digestate, financé par l'Agence Nationale de la Recherche, a pour but de développer une méthode d'évaluation environnementale des traitements des PRO et des scénarios de recyclage. Cette évaluation se base sur les contaminants inorganiques (cuivre, zinc), les polluants organiques (HAP, nonylphénols, pharmaceutiques), les agents pathogènes et l'émergence de résistance antibiotique.

La thèse s'inscrit dans ce projet et a été également soutenue financièrement par l'Agence De l'Environnement et de la Maîtrise de l'Energie (ADEME). Dans le cadre de la thèse, nous nous focalisons sur le zinc (Zn), qui est l'élément trace métallique le plus abondant dans les PRO. L'objectif est donc de déterminer la spéciation du Zn dans les PRO selon le traitement choisi et d'étudier le comportement du Zn dans le sol après épandage des PRO. Nous nous concentrons plus particulièrement sur les nanoparticules de sulfures de Zn (nano-ZnS) en ce qui concerne leur mise en évidence dans les PRO, l'étude de leur formation et stabilité, et enfin leur devenir dans le sol.

Le premier chapitre présente la problématique du Zn dans les PRO et l'état de l'art sur la spéciation du Zn dans les PRO, la formation et la stabilité des nano-ZnS. Puis les objectifs de la thèse, basés sur les questions soulevées par l'analyse bibliographique, seront présentés. Les résultats des trois principaux objectifs sont présentés dans les trois chapitres suivants. Ainsi, le deuxième chapitre traite de l'influence des traitements sur la spéciation du Zn dans les PRO, met en avant l'importance de la phase nano-ZnS dans les digestats et la réactivité de cette phase pendant le compostage. Ces résultats sont présentés tels qu'ils ont été soumis à la revue Environmental Science & Technology. Le

troisième chapitre s'intéresse à l'influence de la matière organique, présente dans un PRO, sur les caractéristiques des nano-ZnS qui peuvent contrôler leur réactivité (taille, contrainte). Enfin, la dernière série de résultats concerne le devenir des nano-ZnS dans le sol et est présenté en deux parties dans le quatrième chapitre: une étude de la cinétique de transformation des nano-ZnS à l'échelle du microcosme avec pour principale question l'influence des caractéristiques du sol sur le devenir des nano-ZnS et la deuxième étude à l'échelle de la parcelle et à plus long terme, 11 ans, sur le devenir de nano-ZnS formés dans un lisier de porc dans un sol argileux. Puis, dans le cinquième chapitre une conclusion générale de la thèse résume les principaux résultats obtenus et leur implication pour l'évaluation du risque environnemental du recyclage des digestats. Enfin, un sixième chapitre apporte des informations supplémentaires sur les matériaux et méthodes utilisés pour l'obtention des résultats présentés.

# **Chapitre 1 - Nécessité de connaître le devenir du zinc des produits résiduels organiques après recyclage en passant par l'étude des nano-ZnS : état de l'art et objectifs**



## Sommaire

<b>1. Problématique du zinc dans les produits résiduaux organiques (PRO)s .....</b>	<b>21</b>
1.1. Définitions .....	21
1.2. Production et gestion des déchets organiques: exemple de la France .....	23
1.3. Traitements appliqués aux PRO: compostage et méthanisation .....	24
1.4. Epandage des digestats .....	26
1.5. Zinc dans les PRO .....	28
1.6. Règlementation dans le cadre de l'épandage des PRO .....	30
<b>2. Spéciation du zinc dans les PRO: information cruciale pour établir le risque .....</b>	<b>32</b>
2.1. Toxicité du zinc.....	32
2.2. Spéciation et (bio)disponibilité: intérêt pour évaluer le risque .....	35
2.2.1. Définitions .....	35
2.2.2. Spéciation du Zn : influence sur la (bio)disponibilité et la toxicité .....	37
2.3. Mise en évidence de ZnS dans les digestats.....	38
2.4. Changement de spéciation durant le traitement aérobie : mise en évidence de la réactivité des ZnS formés dans les PRO .....	41
2.4.1. Spéciation du Zn dans les PRO traités par voie aérobie .....	41
2.4.2. Transformation des ZnS : cinétique rapide .....	42
<b>3. Formation des nano-ZnS .....</b>	<b>43</b>
3.1. Généralités : Nucléation et croissance cristalline .....	44
3.2. Formation des nano-ZnS .....	46
3.2.1. Précipitation abiotique .....	46
3.2.2. Précipitation biogénique .....	48
3.3. Facteurs pouvant influencer les propriétés structurales des nano-ZnS lors de leur formation.....	49
3.3.1. Influence des microorganismes .....	49
3.3.2. Molécules organiques .....	50
<b>4. Facteurs pouvant influencer la réactivité des nano-ZnS.....</b>	<b>54</b>
4.1. Facteurs intrinsèques .....	55
4.1.1. Taille .....	55

4.1.2. Désordre structural .....	56
4.2. Facteurs extrinsèques.....	59
4.2.1. Oxydation abiotique des ZnS .....	59
4.2.2. Microorganismes .....	60
4.2.3. Plantes.....	61
4.2.4. Ligands du sol.....	61
5. Objectifs .....	62
5.1. Effet de la méthanisation et du compostage sur la spéciation du Zn dans les PRO .....	62
5.2. Influence du milieu PRO sur la réactivité des nano-ZnS formées .....	63
5.3. Influence des paramètres extrinsèques sur le devenir des nano-ZnS dans le sol .....	64
Références .....	65



## 1. Problématique du zinc dans les produits résiduaire organiques (PRO)s

Après une liste de définitions des différents termes utilisés, les pratiques de traitement (méthanisation, compostage) puis d'épandage de digestats de méthanisation seront évoquées. Les concentrations en zinc (Zn) dans plusieurs types de PRO seront présentées ainsi que les différentes normes qui visent à limiter le risque de contamination des sols.

### 1.1. Définitions

Le terme de déchet organique est utilisé selon les définitions suivantes.

- *Déchet*: toute substance ou tout objet, ou plus généralement tout bien meuble, dont le détenteur se défait ou dont il a l'intention ou l'obligation de se défaire<sup>1</sup>. Un déchet cesse d'être un déchet après avoir été traité et avoir subi une opération de valorisation, notamment de recyclage ou de préparation en vue de sa réutilisation et s'il répond à un ensemble de critères<sup>2,3</sup>,
- *Organique*: adjectif pour définir un composé provenant directement ou indirectement de tissus ou d'organismes vivants qui contiennent toujours du carbone.

Ainsi, les déchets organiques correspondent à toute substance organique dont le détenteur se défait et n'ayant pas été traitée dans le but d'une réutilisation. Dans d'autres contextes, les déchets organiques sont aussi appelés déchets putrescibles, c'est-à-dire qui peuvent être dégradés par les bactéries et champignons. Voici quelques exemples de déchets organiques :

- *Biodéchets*: tout déchet non dangereux biodégradable de jardin ou de parc, tout déchet non dangereux alimentaire ou de cuisine issu notamment des ménages, des restaurants, des traiteurs ou des magasins de vente au détail, ainsi que tout déchet comparable provenant des établissements de production ou de transformation de denrées alimentaires,<sup>4</sup>

---

<sup>1</sup> Code de l'environnement, Article L541-1-1, Créé par Ordonnance n°2010-1579 du 17 décembre 2010 – art. 2, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

<sup>2</sup> La substance ou l'objet est couramment utilisé à des fins spécifiques ; il existe une demande pour une telle substance ou objet ou elle répond à un marché ; la substance ou l'objet remplit les exigences techniques aux fins spécifiques et respecte la législation et les normes applicables aux produits, par exemple des teneurs limites en polluants ; son utilisation n'aura pas d'effets globaux nocifs pour l'environnement ou la santé humaine

<sup>3</sup> Code de l'environnement, Article L541-4-3, Créé par Ordonnance n°2010-1579 du 17 décembre 2010 – art. 4, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

<sup>4</sup> Code de l'environnement, Article R541-8, Modifié par Décret n° 2016-288 du 10 mars 2016 – art. 6, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

- *Déchets organiques issus de l'agriculture*: effluents d'élevage et résidus de culture
- *Boues de station d'épuration (STEP)*: résidu organique issu du traitement des eaux urbaines qui se fait dans les STEP
- *Déchets organiques municipaux*: les déchets solides municipaux sont les déchets collectés et traités par ou pour les municipalités et comprennent les déchets des ménages (dont les encombrants), du commerce, des bureaux, des jardins, le balayage des chaussées, contenu des poubelles urbaines. Globalement, les déchets solides municipaux sont composés à 46% de matière organique et 17% de papier et cartons, soient des matières valorisables par voie biologique (Hoornweg et Bhada-Tata, 2012).

Ces différents groupes de déchets organiques peuvent se recouper. Par exemple, les déchets organiques municipaux incluent des biodéchets. Dans le cadre de la thèse, nous nous intéressons au recyclage des déchets organiques traités et non traités. Les déchets organiques traités dans le but de leur valorisation, par compostage par exemple, ne sont plus des déchets. Ainsi, nous utiliserons le terme plus général de Produit Résiduaire Organique, défini par l'INRA<sup>1</sup> qui comprend les déchets organiques traités et non traités.

- *Produit Résiduaire Organique (PRO)*: toutes les matières résiduelles organiques pouvant être épandues en agriculture à l'état brut ou traitées dans le but de fertiliser et/ou d'amender. Le terme PRO regroupe ainsi les effluents d'élevage et les matières organiques, traitées ou non, provenant de l'agriculture (ex. bois de taille), des activités urbaines (ex. boues de STEP, ordures ménagères), des industries agro-alimentaires (ex. vinasses, plumes, boues de laiteries) et autres industries (ex. boues papetières)<sup>2</sup>
- *Amendement organique*: matières fertilisantes composées principalement de combinaisons carbonées d'origine végétale, ou animale et végétale en mélange, destinées à l'entretien ou à la reconstitution du stock de matière organique du sol et à l'aménagement de ses propriétés physiques et/ou chimiques et/ou biologiques,<sup>2</sup>
- *Fertilisant*: engrais, amendements et, d'une manière générale, tous les produits dont l'emploi est destiné à assurer ou à améliorer la nutrition des végétaux, ainsi que les propriétés physiques, chimiques et biologiques des sols,<sup>2</sup>
- *Épandage*: action d'étendre un produit, une matière présentant un intérêt agronomique sur le sol en le dispersant.

---

<sup>1</sup> INRA, 2017. Valorisation agricole des Produits Résiduels Organiques SOERE PRO – Définitions, <https://www6.inra.fr/valor-pro/Lexique-et-definitions/Definitions>

<sup>2</sup> AFNOR, 2006. Amendements organiques – Dénominations et marquage, NFU 044-051.

## **1.2. Production et gestion des déchets organiques: exemple de la France**

Dans le monde, la production de déchets est amenée à doubler d'ici 2025 étant donné l'augmentation de la population et l'urbanisation générale (Hoornweg et Bhada-Tata, 2012). C'est pourquoi il est nécessaire d'assurer leur gestion, par exemple par leur valorisation.

Actuellement, les PRO sont soit épandus sur les sols agricoles pour apporter matière organique et nutriments (azote, phosphore, potassium), soit incinérés ou mis en décharge. Quelques chiffres sur les PRO épandus:

- Parmi les PRO issus de l'agriculture (effluents d'élevage, résidus de culture), les effluents d'élevage récupérables, c'est-à-dire les déjections émises en bâtiments, sont épandus sur les sols agricoles en quasi-totalité. Cela représente 109 millions de tonnes de matière brutes ainsi que 4 tonnes de compost d'effluents d'élevage en 2012 (Houot *et al.*, 2014);
- Pour les PRO d'origine industrielle : 1,8 million de tonnes de matière sèche (MS) ont été épandues sur les sols agricoles ainsi que 0.3 million de tonnes de MS après traitement biologique en 2008 (Houot *et al.*, 2014);
- Parmi les PRO d'origine urbaine (boues de STEP, déchets verts des ménages et collectivités), 42 % de la production actuelle de boues de STEP ont été épandues sans traitement (0,4 million de tonnes de MS) et 31 % après compostage (0,3 million de tonnes de MS) en 2011. Les déchets verts des ménages et collectivités sont plutôt utilisés pour le compostage des ordures ménagères résiduelles des particuliers et des boues de STEP. En effet, les déchets verts sont un bon agent structurant pour le compost et permettent d'avoir un rapport carbone/azote optimal pour le procédé de compostage (Houot *et al.*, 2014).

En France, la loi de transition énergétique pour la croissance verte (TECV) d'août 2015<sup>1</sup> fixe comme objectifs, entre autres, de réduire de 50 % la quantité de déchets mis en décharge à l'horizon 2025 et que 55% des déchets non dangereux non inertes feront l'objet d'une valorisation sous forme de matière en 2020, 65% en 2025. Notamment, les mesures concrètes sont :

- Tous les producteurs professionnels de biodéchets auront l'obligation de les valoriser par un retour au sol en 2025,

---

<sup>1</sup> Journal Officiel de la République Française n°0189 du 18 août 2015, page 14263. Texte n°1 : Loi n°2015-992 du 17 août 2015 relative à la transition énergétique pour la croissance verte, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

- Les collectivités sont encouragées à développer des solutions de tri à la source des déchets organiques ainsi que des solutions techniques de proximité (collecte, compostage et/ou méthanisation).

Ainsi, les pratiques de traitement des PROs par méthanisation et/ou compostage sont amenés à se développer en raison de la politique actuelle favorisant l'économie circulaire dans le cadre de la transition énergétique.

### **1.3. Traitements appliqués aux PRO: compostage et méthanisation**

Les PRO peuvent être épandus sans subir de traitement. C'est le cas de la majorité des déchets organiques recyclés (96% des effluents d'élevage en 2012, 85% des effluents industriels en 2008, 42 % des boues de station d'épuration en 2011 (Houot *et al.*, 2014). Les déchets peuvent aussi subir un traitement hors sol avant épandage. Deux traitements biologiques sont possibles: la méthanisation (digestion anaérobie) et/ou le compostage (digestion aérobie).

Le compostage est un procédé biologique de décomposition de la matière organique qui a lieu naturellement en milieu aérobie (Figure 1). Premièrement, les composés organiques simples sont minéralisés par les microorganismes, ce qui produit du CO<sub>2</sub>, NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>O, des acides organiques et de la chaleur (Bernal *et al.*, 2009). La température au sein du compost pendant la première phase de dégradation est comprise entre 50 et 70°C, ce qui permet d'hygiéniser les PRO. Durant une seconde phase de maturation, la température est plus faible (35-45°C). Le produit final du compostage est une substance organique stable riche en humus destinée à être épandue en agriculture (Houot *et al.*, 2014). En pratique, l'aération est contrôlée soit par ventilation ou par retournement de tas de compost appelés andains.



*Figure 1 : au premier plan, tas de compost en première phase de compostage, la fumée illustre la forte chaleur dans le tas de compost. En arrière-plan, compost en andain en phase de maturation, et engin utilisé pour retourner les andains. Photo prise sur la plateforme de compostage de Berneuil dans l'agglomération de Limoges.*

La méthanisation ou digestion anaérobie est un processus de dégradation biologique de la matière organique lors de plusieurs réactions en série et en parallèle : l'hydrolyse, l'acidogénèse, l'acétogénèse et la méthanogénèse. Durant l'hydrolyse, les bactéries fermentatives sécrètent des enzymes qui dégradent les polymères en molécules plus petites qui peuvent traverser les parois cellulaires des bactéries acidogènes. Les protéines sont hydrolysées en acides aminés, les polysaccharides en sucres simples et en lipides et les graisses en acides gras. L'acidogénèse consiste en la fermentation de ces petites molécules. Les produits principaux de cette acidification sont l'acétate, des acides gras volatiles organiques tels que le propionate ou le butyrate et du dioxyde de carbone ( $\text{CO}_2$ ). Les bactéries acétogènes convertissent les acides gras volatiles en acétate, hydrogène ( $\text{H}_2$ ) et  $\text{CO}_2$ . Leur métabolisme est inhibé par une concentration trop forte en hydrogène. Elles vivent en syntrophie avec les bactéries méthanogènes qui réduisent soit le  $\text{CO}_2$  soit l'acétate en utilisant l'hydrogène comme donneur d'électron pour produire le biogaz (Figure 2) (Moletta, 2008).

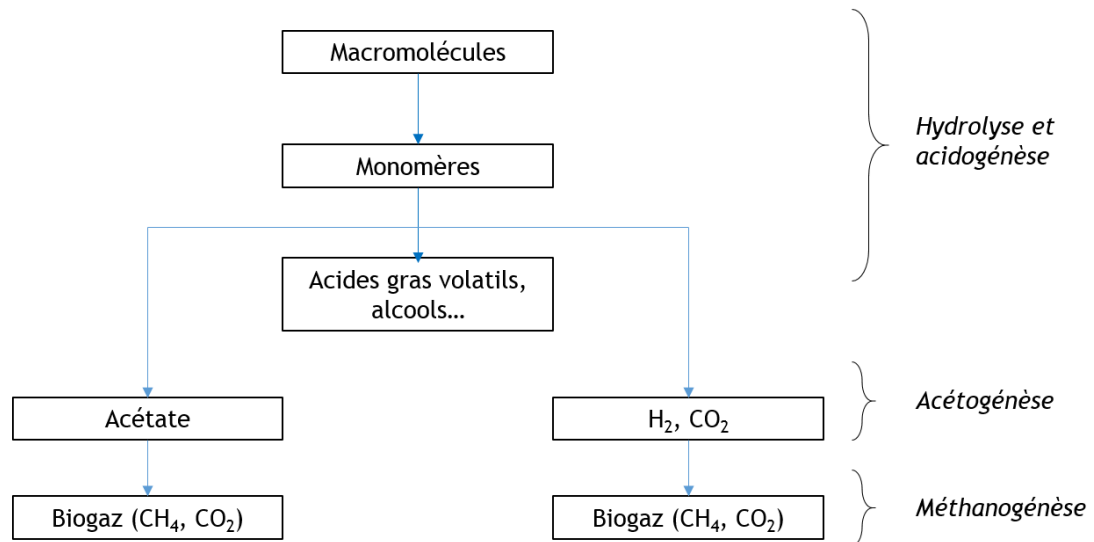


Figure 2 : schéma des étapes de la méthanisation adapté de Moletta (2008)

Au final, la méthanisation transforme la matière organique en deux produits: le biogaz composé principalement de méthane (CH<sub>4</sub>) (50 à 75%), CO<sub>2</sub> (25-50%) et moins de 1% de NH<sub>3</sub>, H<sub>2</sub>S, H<sub>2</sub>O, O<sub>2</sub>, N<sub>2</sub> et le digestat qui est le résidu organique de la transformation. Ce procédé présente donc un fort potentiel car il permet de produire de l'énergie renouvelable (le biogaz) et de réduire le volume des déchets organiques. En France, on comptait seulement 40 unités de méthanisation en 2011 et suite au développement de cette technologie on en comptait 600 en 2016 (Ademe, 2017). Les politiques nationales encouragent le développement de la méthanisation: l'Etat français lance un appel à projet pour construire 1500 méthaniseurs (Ademe, 2015). Le Sénégal a également pour objectif l'installation de 10 000 nouvelles unités de biogaz domestiques via le Programme National de Biogaz domestique (PNB-SN) afin de valoriser les résidus agricoles et domestiques pour produire de l'énergie et fertilisant. L'Allemagne comptait 7720 unités de méthanisation fin 2013 (Lebuhn *et al.*, 2014).

#### 1.4. Epandage des digestats

Le traitement par méthanisation représente encore une faible proportion des PRO recyclés. En France, en 2014, moins de 1% des effluents d'élevage français sont traités par méthanisation avant leur épandage, ce qui représente tout de même 1,1 million de tonnes de matière brute. Ce procédé est plus courant pour traiter les boues de STEP : 0,36 millions de tonnes de matière sèche sont traitées par méthanisation en 2014 tandis que l'épandage sans traitement représente 0,4 million de tonnes de matière sèche en 2011 (Houot *et al.*, 2014). Selon les estimations de l'ADEME, les boues de STEP méthanisées représentent 26% du gisement total des boues de STEP en France (Ademe et GRDF, 2014). Au Danemark, en 2005, 47% des boues de STEP sont traitées par voie anaérobie (Jensen *et al.*, 2017).

Après traitement, les déchets organiques cessent d'être des déchets, selon la définition des déchets donnée dans la partie 1.1. . L'arrêté du 13 juin 2017<sup>1</sup> donne le statut de produit aux digestats de méthanisation d'origine agricole, ce qui facilite sa mise sur le marché et son utilisation en tant que matière fertilisante.

Des expérimentations en mésocosmes montrent que le recyclage des digestats permet un meilleur recyclage de l'azote par rapport aux PRO bruts car la proportion d'azote minéral augmente (Möller et Müller, 2012). L'azote sous forme minérale est plus disponible pour les plantes et les microorganismes que l'azote organique contenu dans les protéines par exemple. De même, le phosphore organique est converti en  $\text{PO}_4^{3-}$  pendant la méthanisation qui sera directement disponible pour l'assimilation par les plantes (Crolla *et al.*, 2013). Des expérimentations en plein champ montrent que les rendements des cultures fertilisées avec des digestats sont similaires ou meilleures que les rendements des cultures fertilisées avec ces mêmes PRO non digérés (Crolla *et al.*, 2013; Nkoa, 2014).

Avant son recyclage sur les sols agricoles, le digestat peut subir un certain nombre de traitements (séparation solide liquide, compostage, stockage en attendant la période d'épandage). Son application en agriculture peut se faire sous différentes formes selon son taux de matière sèche (par exemple, l'agriculteur peut choisir aussi d'incorporer directement le digestat dans le sol ou de seulement le déposer) (Al Seadi *et al.*, 2013).

Devant le fort intérêt pour le procédé de méthanisation, il est important de déterminer le risque environnemental lié au recyclage du digestat. Malgré les atouts démontrés du digestat par rapport au déchet brut, l'effet à long terme de l'épandage de digestat sur les propriétés du sol n'est pas très bien connu aujourd'hui. Parmi les contaminants potentiels, le Zn est l'élément trace le plus apporté sur les sols agricoles en France, Royaume-Uni, Suisse, Chine, Pays-Bas et en Allemagne, Figure 3 (Belon *et al.*, 2012). De plus, Legros *et al.* (2017) ont montré que la concentration en Zn d'un PRO augmente après méthanisation. C'est pourquoi nous nous intéressons au Zn dans les PRO et à son devenir suite à l'épandage des PRO.

---

<sup>1</sup> Journal Officiel de la République Française n°0142 du 18 juin 2017, texte n°13. Arrêté du 13 juin 2017 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricoles en tant que matières fertilisantes

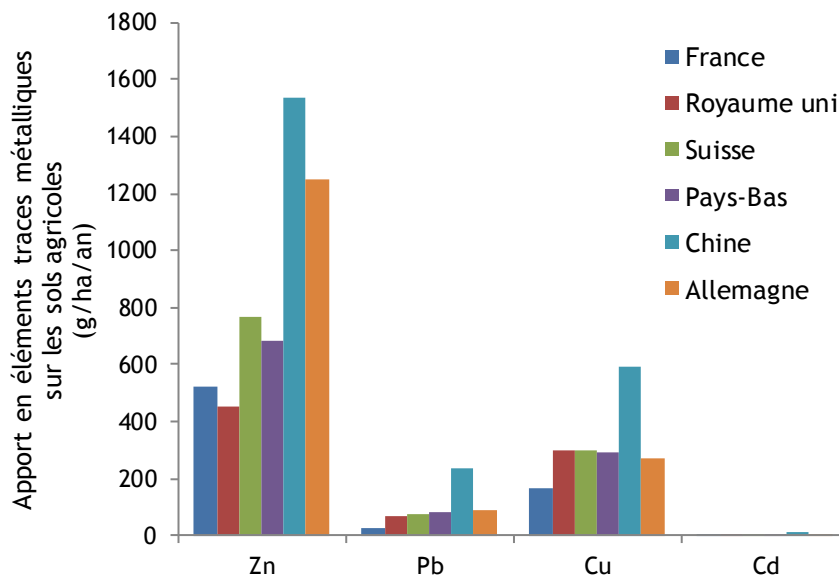


Figure 3 : Apport en zinc, plomb, cuivre et cadmium sur les sols agricoles en France, Royaume-Uni, Suisse, Pays-Bas, Chine et Allemagne d'après Belon et al. (2012)

### 1.5. Zinc dans les PRO

Pour les pays européens, ce sont les lisiers (solides et liquides) de porc qui sont les plus concentrés en Zn (rapporté au taux d'azote) parmi les effluents d'élevage, suivis des fientes de volaille puis des fumiers de chèvres et brebis, Tableau 1 (Leclerc et Laurent, 2017). La présence de Zn dans les effluents d'élevage s'explique par l'utilisation de Zn (et de cuivre) dans l'alimentation du bétail comme promoteurs de croissance et antibiotiques et une très faible assimilation du Zn par les animaux (Romeo *et al.*, 2014). Les boues de station d'épuration présentent de fortes concentrations en Zn, Tableau 1 (Kim *et al.*, 2014; Alvarenga *et al.*, 2015). Le Zn présent dans les boues de station d'épuration peut avoir différentes origines: produits du quotidien (dentifrice, shampoing), eaux de ruissellement ayant lessivé le Zn des toitures, routes...



*Tableau 1 : Comparaison des concentrations en zinc dans les différents effluents d'élevage indiquées dans la littérature*

Type de PRO	Caractéristiques		[Zn]	Unité	Référence
Effluent d'élevage	Type d'élevage	Type d'effluent			
	Vaches laitières	Solide	4.96		
		Liquide	4.14		
	Bovins	Solide	4.96		
		Liquide	5.4		
	Porcs	Solide	33.1		
		Liquide	9.34	g/kg <sub>N</sub>	(Leclerc et Laurent, 2017)
	Brebis et chèvres		6.16		
	Poules pondeuses		8.83		
	Poulet de chair		7.06		
	Canard		15.4		
	Porcs		2513	mg/kg <sub>MS</sub>	(Alburquerque <i>et al.</i> , 2012)
	Bovins		423		
	Bovins		137-473	mg/kg <sub>MS</sub>	(Zirkler <i>et al.</i> , 2014)
	Porcs		1158 – 4019		
	Volaille		43		
Boues de STEP			1530	mg/kg <sub>MS</sub>	(Kim <i>et al.</i> , 2014)
Boues de STEP			581 – 757	mg/kg <sub>MS</sub>	(Alvarenga <i>et al.</i> , 2015)
Déchets d'IAA <sup>1</sup>			84		

En France, 15 000 tonnes de Zn sont apportés au sol chaque année selon les estimations de Belon *et al.* (2012) et 5 840 selon les estimations de Leclerc et Laurent (2017). Environ 80% de cet apport est dû au recyclage des effluents d'élevage en tant que fertilisant en France (Belon *et al.*, 2012), 40% aux UK (Nicholson *et al.*, 2003), 51% en Chine (Luo *et al.*,

<sup>1</sup> Industries agro-alimentaires

2009). Jensen *et al.* (2016) ont montré une augmentation de la concentration en Zn dans un grand nombre de sols agricoles danois amendés par des lisiers de porcs. Une augmentation de la concentration en Zn total a aussi été observée sur des sols amendés avec des composts de déchets ménagers (Hargreaves *et al.*, 2008).

De telles concentrations dans les PRO et l'augmentation de la concentration en Zn dans le sol mettent en avant le risque de contamination des sols via le recyclage des digestats. Une prise en compte des impacts potentiels est nécessaire ainsi qu'un encadrement rigoureux de l'épandage des digestats pour limiter ce risque.

## **1.6. Règlementation dans le cadre de l'épandage des PRO**

Pour limiter l'accumulation de Zn dans le sol, des réglementations ont été mises en place concernant la concentration en Zn (mais aussi des autres éléments traces métalliques (ETM), de polluants organiques et pathogènes) de certains types de PRO épandus sur les sols en tant qu'amendement organique ou fertilisant. Il existe plusieurs critères pour autoriser l'épandage d'un PRO : la concentration en Zn du PRO, la quantité d'apport de Zn par ha/an, la concentration en Zn dans le sol. Il existe également des seuils pour lesquels un PRO peut être normé et homologué pour être vendu sous forme de produit. Une nouvelle réglementation autorise la mise sur le marché de digestats de méthanisation d'origine agricole s'ils respectent le cahier des charges établi par l'arrêté du 13 juin 2017<sup>1</sup> (Tableau 2).

---

<sup>1</sup> Journal Officiel de la République Française n°0142 du 18 juin 2017, texte n°13. Arrêté du 13 juin 2017 approuvant un cahier des charges pour la mise sur le marché et l'utilisation de digestats de méthanisation agricoles en tant que matières fertilisantes, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

Tableau 2 : Critères mis en place pour l'épandage, la mise sur le marché ou la normalisation de certains PRO

Pays	Type de PRO	[Zn] <sub>max</sub> dans le sol mg/kg <sub>MS</sub>	Apport max de Zn sur 10 ans kg/ha/an	[Zn] <sub>max</sub> dans le PRO mg/kg <sub>MS</sub> Pour épandage
France	Tout type de PRO - Normalisation <sup>1</sup>		3	600
	Digestat de méthanisation d'origine agricole – mise sur le marché <sup>1</sup>		30	1500
	Boues de STEP et digestats – épandage <sup>2,3</sup>	300	45 30 pour pH <sub>sol</sub> <6	3000
UE <sup>4</sup>	Boues de STEP - épandage	150-300	30	2500 - 4000

Il est difficile d'établir une concentration en Zn pour laquelle l'épandage des PRO affecte la qualité du sol. C'est pourquoi il est nécessaire de considérer d'autres critères que la concentration totale pour évaluer le risque de recycler un PRO. Notamment, Warne *et al.* (2008) ont étudié la toxicité du Zn pour le blé dans 14 différents types de sol. Ils montrent une corrélation entre la quantité de Zn provoquant 20 et 50% de diminution de croissance du blé et la capacité d'échange cationique (CEC) des sols. La quantité de Zn provoquant 10% de diminution de croissance est corrélée au pH et à la concentration en carbone organique des sols. Les auteurs recommandent donc de considérer ces paramètres dans la réglementation.

Etant donné l'augmentation de la production de PRO et la forte teneur en Zn de ces PRO, il y a une accumulation potentielle du Zn dans le sol ou de lixiviation vers les nappes phréatiques. Ces deux cas pourraient avoir pour conséquence une diminution de la qualité des sols.

<sup>1</sup> AFNOR, 2002. Amendements organiques – Composts contenant des matières d'intérêt agronomique, issues du traitement des eaux, NFU 44-095

AFNOR, 2006. Amendements organiques – Dénominations et marquage, NFU 044-051.

<sup>2</sup> Arrêté du 8 janvier 1998 fixant les prescriptions techniques applicables aux épandages de boues sur les sols agricoles pris en application du décret n° 97-1133 du 8 décembre 1997 relatif à l'épandage des boues issues du traitement des eaux usées. Version consolidée du 16 décembre 2018, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

<sup>3</sup> Journal Officiel de la République Française n°0130 du 8 juin 2018, texte 14. Arrêté du 6 juin 2018 modifiant l'arrêté du 12 août 2010 relatif aux prescriptions générales applicables aux installations classées de méthanisation relevant du régime de l'enregistrement au titre de la rubrique n° 2781-1 de la nomenclature des installations classées pour la protection de l'environnement, <https://www.legifrance.gouv.fr/>

<sup>4</sup> Directive 86/278/CEE du Conseil du 12 juin 1986 relative à la protection de l'environnement et notamment des sols, lors de l'utilisation des boues d'épuration en agriculture, <https://eur-lex.europa.eu/>

**Cette première partie de revue de la littérature et du contexte sociétal et politique montre qu'il y a une réelle nécessité d'établir le risque environnemental du recyclage des PRO, et notamment des digestats, vis-à-vis du zinc.**

Le risque vis-à-vis d'un polluant est défini comme la combinaison de deux paramètres :

- la probabilité d'exposition au polluant, qui dépend de l'émission du polluant et de son devenir (persistance, transport, dégradation) et,
- la toxicité du polluant envers les organismes vivants.

Pour l'instant, les législations mises en place pour limiter le risque ne considèrent que la concentration en Zn total. Ce critère facilement mesurable décrit l'émission du polluant. C'est donc une première information pour évaluer la probabilité d'exposition d'une substance mais ce n'est pas suffisant. En effet, la forme chimique sous laquelle se trouve le polluant contrôle son devenir (transport, biodisponibilité) mais aussi sa toxicité. Nous considérons donc un autre critère crucial pour évaluer le risque environnemental et ainsi le diminuer: la spéciation du Zn.

## **2. Spéciation du zinc dans les PRO: information cruciale pour établir le risque**

Dans cette partie, la toxicité potentielle du Zn sera mise en évidence. Puis nous verrons comment la spéciation contrôle la toxicité après avoir défini le terme de biodisponibilité. Ensuite, les données existantes sur la spéciation du Zn dans les digestats seront présentées et discutées. Enfin, nous verrons que la spéciation du Zn peut changer lors du compostage.

### **2.1. Toxicité du zinc**

Le Zn est un élément essentiel pour les organismes vivants. Cependant, il peut être toxique dans certaines conditions. Il est difficile d'établir un seuil général au-delà duquel le Zn est toxique pour les microorganismes du sol. En effet, il existe une grande disparité entre les concentrations en métaux les plus hautes sans effet (ou les plus basses avec un effet) déterminées selon différentes études (facteur 100 ou 1000). Ces disparités peuvent être expliquées par une modification de la toxicité selon les conditions du système étudié et une sensibilité différente selon les organismes étudiés. Dans une même étude, la toxicité est également très variable selon le sol (Giller *et al.*, 1998).

Après l'apport sur un sol d'une boue de STEP contaminée en métaux, le rendement de trèfle a diminué de 60% par rapport à un sol témoin sans amendement. Les auteurs ont observé des nodules plus petits et moins roses au niveau des racines du trèfle qui a poussé

sur le sol amendé, ce qui est caractéristique d'un légume présentant une souche de rhizobium (bactéries fixatrices d'azote) inefficace (Giller *et al.*, 1998). Plus spécifiquement, l'étude de Chaudri *et al.* (2000) montre que la baisse du rendement de pois et de trèfle blanc est corrélée avec la concentration en Zn total dans le sol, la concentration en Zn total de l'eau porale, et la concentration en  $Zn^{2+}$  de l'eau porale du sol amendé avec des boues de STEP (Chaudri *et al.*, 2000). Les concentrations pour lesquelles des effets toxiques sont observés dans cette étude sont indiquées dans le Tableau 3. Le seuil de toxicité du Zn pour le blé varie de 30 à 40 fois selon la nature du sol. Il est cependant possible d'établir des corrélations entre la quantité de Zn provoquant 20 et 50% de diminution de la croissance du blé (EC20 et EC50 respectivement) avec la capacité d'échange cationique (Warne *et al.*, 2008).

Tableau 3 : Concentration en Zn ayant un effet sur la croissance de pois et de trèfle blanc d'après l'étude de terrain de Chaudri et al. (2000)

Système	Effet sur la plante	[Zn]		
		Concentration total du sol mg/kg	Concentration en Zn dans l'eau porale (mg/L)	Concentration en Zn libre <sup>1</sup> dans l'eau porale (mg/L)
Pois	25% de baisse de rendement de graines	150	2	0.7
Pois	25 % de baisse d'accumulation d'azote par les graines	150	1.5	1
Rhizobium de pois	EC50 <sup>2</sup>	230	7	3
Rhizobium de trèfle blanc	EC50	300	15	6

Sous forme d'ion libre en solution, le Zn n'est pas l'ion métallique le plus toxique. En effet, Kopittke *et al.* (2014) ont montré que la concentration à partir de laquelle un élément métallique est toxique pour les plantes est plus faible pour les éléments ayant une forte affinité pour les ligands forts. Par exemple, le groupement carboxylique (R-COO-), qui est un ligand fort, fait partie de nombreux composés des parois cellulaires. Les ETM ayant une forte affinité pour les ligands forts provoquent une rupture de la racine. Le Zn fait partie des ETM ayant une faible affinité pour les ligands forts, donc est toxique à des concentrations plus élevées que Cu<sup>2+</sup> ou Hg<sup>2+</sup> par exemples, Tableau 4 (Kopittke *et al.*, 2014).

Tableau 4 : Concentrations en 3 éléments pour lesquelles des effets toxiques sont observés sur le pois dans l'étude de Kopittke et al. (2014)

ETM	EC50 <sup>3</sup> µmol/L
Cu <sup>2+</sup>	0.29
Hg <sup>2+</sup>	0.59
Zn <sup>2+</sup>	16

Dans leur étude sur l'impact du recyclage des effluents agricoles dans le monde, Leclerc et Laurent (2017) ont utilisé le modèle USEtox 2.02 pour évaluer la toxicité de As, Cr, Hg, Pb, Cd, Cu, Ni et Zn sur la santé humaine. Le principe est de calculer un indicateur pour

<sup>1</sup> Mesuré à l'aide d'une résine échangeuse de cations

<sup>2</sup> Concentration qui induit une diminution de 50% du nombre de cellules par rapport à un sol non amendé par les boues contaminées

<sup>3</sup> Concentration dans la solution de sol pour laquelle une réduction des racines de pois de 50 % est observée

chaque substance qui considère trois facteurs: (i) facteur devenir, c'est-à-dire le transport et la distribution de la substance dans le milieu, (ii) facteur exposition, c'est-à-dire le transfert de la substance vers les organismes vivants et (iii) facteur effet, c'est-à-dire la probabilité que la substance ait un effet sur les organismes vivants en distinguant les effets cancérigènes et non cancérigènes. Il s'avère que le Zn est l'élément qui contribue le plus à la toxicité pour l'homme concernant les effets non cancérigènes à l'issu du recyclage d'effluents d'élevage d'après ce modèle (Figure 4). Les pays potentiellement les plus affectés par le risque de toxicité humaine par le Zn lié au recyclage des effluents sont les pays Européens et les pays d'Asie du Sud Est car ce sont les pays qui produisent le plus d'effluents d'élevage (Leclerc et Laurent, 2017).

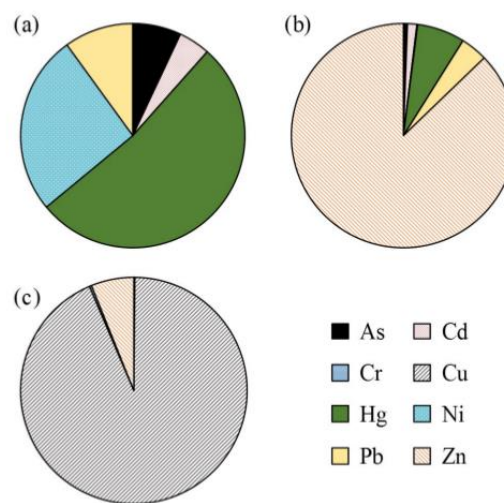


Figure 4 : Implication des élément traces métalliques suite à l'épandage d'effluents d'élevage dans le monde en 2013 pour (a) la toxicité humaine (effets cancérigènes), (b) la toxicité humaine (effets non cancérigènes), (c) l'écotoxicité des eaux de rivières. Figure extraite de Leclerc et Laurent (2017)

## 2.2. Spéciation et (bio)disponibilité: intérêt pour évaluer le risque

### 2.2.1. Définitions

Avant d'entamer cette partie, il est important de définir certains termes qui peuvent être définis de différentes manières selon les contextes. Ainsi, les termes suivants seront employés selon les définitions suivantes:

- *Biodisponible*: composé qui est disponible pour traverser la membrane d'un organisme vivant depuis le milieu dans lequel cet organisme se trouve à un instant donné (Naidu et al. 2008). Le concept de biodisponibilité dans le sol peut être

divisé entre 3 composantes qui ont été définies consensuellement par un groupe de travail international pour établir la norme de qualité du sol ISO 17402<sup>1</sup>:

- Disponibilité environnementale: qui décrit les processus physico-chimiques régissant la partition de la substance étudiée entre la phase solide et la phase liquide du sol ou du sédiment. Cette fraction, déterminée par des méthodes physico-chimiques, sera appelée **disponible**.
- Biodisponibilité environnementale: qui dépend de processus physiologiques particuliers à l'espèce considérée régissant le prélèvement de la substance. Cette fraction, déterminée par des méthodes biologiques, sera appelée **biodisponible**.
- Biodisponibilité toxicologique: qui correspond à l'accumulation du contaminant dans l'organisme ou à la mise en évidence d'effet toxicologique. Cette fraction sera appelée **toxique**.
- *Bioaccessible*: composé qui est disponible pour traverser la membrane d'un organisme vivant depuis le milieu dans lequel cet organisme se trouve, si l'organisme y a accès. Cependant, ce composé peut être biodisponible seulement après une certaine durée ou retiré de l'organisme. La fraction bioaccessible comprend donc la fraction biodisponible ainsi que la fraction potentiellement disponible (par exemple un composé isolé qui peut devenir disponible avec le temps ou des réarrangements du milieu) (Naidu *et al.*, 2008),
- *Spéciation*: distribution d'un élément parmi différentes espèces chimiques (Templeton *et al.*, 2000),
- *Espèce chimique*: forme spécifique d'un élément, définie par sa composition isotopique, son état d'oxydation ou électronique et/ou sa structure géométrique ou moléculaire. Exemples: ions libres, complexes (organiques/inorganiques), paires d'ions, phases solides amorphes et cristallines (Templeton *et al.*, 2000).

Ainsi, c'est la fraction biodisponible du Zn qui a un effet toxique sur les organismes vivants du sol au-delà d'une certaine concentration de Zn biodisponible. La spéciation d'un élément influence sa réactivité, sa mobilité et sa biodisponibilité. C'est donc une information importante pour estimer la biodisponibilité et la bioaccessibilité d'un élément (Nolan *et al.*, 2003).

---

<sup>1</sup> ISO 17402 (2006). Soil quality – Requirements and guidance for the selection and application of methods for the assessment of bioavailability of contaminants in soil and soil materials



### 2.2.2. Spéciation du Zn : influence sur la (bio)disponibilité et la toxicité

Wang *et al.* (2009) ont étudié la biodisponibilité du Zn pour le phytoplancton et les copépodes (petits crustacés). La matière organique dissoute (MOD) extraite de l'eau de mer, c'est à dire les composés organiques ayant une taille comprise entre 1 kDa et 0.2  $\mu\text{m}$ , a été radiomarquée avec  $^{65}\text{Zn}$  pour suivre l'assimilation du Zn par les organismes vivants étudiés. Les auteurs concluent que le Zn est moins biodisponible lorsqu'il est associé à la MOD que le Zn sous forme ionique. Le modèle FIAM (Free Ion Activity Model) prédit la biodisponibilité des métaux en se basant sur leur activité. Ce modèle considère que la complexation avec les ligands organiques diminue l'activité des métaux et donc diminue leur assimilation par les organismes vivants. En effet, Van Ginneken *et al.* (1999) montrent dans leur étude sur les carpes dans des eaux de rivières en présence de différents ligands organiques que l'assimilation du Zn par les carpes peut être prédite par le modèle FIAM en considérant l'activité du Zn, sauf en présence de citrate. Wenger *et al.* (2005) dressent une liste de nombreux cas où le modèle FIAM n'a pas été capable de prédire l'assimilation des métaux par les organismes vivants. Par exemple, il a été montré que l'orge, le blé et le maïs sont capables d'assimiler le Zn complexé à des sidérophores, polypeptides de masse moléculaire faible (<1000 Da). En bref, la biodisponibilité du Zn dépend de sa spéciation. Par exemple, la complexation par des ligands organiques diminue la biodisponibilité dans certains cas, comme supposé par le modèle FIAM et montré par Wang *et al.* (2009). Cependant, ce n'est pas systématique car certains complexes de petite taille peuvent aussi être biodisponibles, c'est pourquoi le modèle FIAM n'est pas toujours capable de prédire la biodisponibilité des métaux.

Gelabert *et al.* (2016) ont comparé la toxicité des nanoparticules de ZnO et de  $\text{Zn}^{2+}$  sur deux souches d'*Escherichia coli* en considérant la dissolution des ZnO. Les auteurs observent que la dissolution des ZnO n'est pas la seule cause de toxicité de ZnO envers les souches d'*Escherichia coli*: la toxicité des nano-ZnO est plus importante que celle des sels de Zn seuls. De plus, les deux souches d'*E. coli* génétiquement très proches mais avec des métabolismes différents n'ont pas même sensibilité envers les nano-ZnO (Gelabert *et al.*, 2016). Cette étude confirme que la toxicité du Zn dépend de sa spéciation, mais également de l'organisme vivant considéré. C'est pourquoi il est compliqué d'établir un seuil de toxicité unique pour l'ensemble des organismes présents dans un écosystème.

Comme évoqué précédemment, la réglementation à propos du recyclage agricole des boues de STEP et digestats est basée sur des seuils de concentration. Cependant, il s'agit de la concentration totale des éléments trace métalliques (ETM) qui n'est pas représentative de la fraction biodisponible et donc potentiellement toxique (Nolan *et al.*, 2003).

Tella *et al.* (2016) ont utilisé la DGT pour déterminer la fraction de Zn disponible dans le sol amendé avec des PRO. La DGT est une technique adéquate pour déterminer la disponibilité des ETM dans le sol (Zhang *et al.*, 2004; Hooda et Zhang, 2008). De plus, la

spéciation du Zn dans les PRO a été évaluée par spectroscopie EXAFS (Extended X-ray Absorption Fine Structure) qui est une technique appropriée pour déterminer directement la spéciation du Zn dans un PRO (Legros *et al.*, 2010a; Legros *et al.*, 2010b). Ainsi, Tella *et al.* (2016) ont montré que la spéciation du Zn dans le PRO a une influence sur la disponibilité du Zn dans le sol. Dans ce sol argileux, la disponibilité du Zn est corrélée à la proportion de Zn sorbé aux oxydes de fer. L'hypothèse pour expliquer ce mécanisme est que la disponibilité du Zn est contrôlée par la désorption suite la baisse de pH induite par la minéralisation de la matière organique des PRO (Tella *et al.*, 2016).

C'est pourquoi la spéciation du Zn dans les PRO est une information importante pour évaluer le risque lié au recyclage des PRO en agriculture. L'influence des différents traitements appliqués avant épandage ainsi que de la composition du PRO sur la spéciation du Zn n'est pas très bien connue. L'EXAFS est une technique de pointe qui nécessite l'utilisation de rayons X avec une énergie et un flux fournis par le rayonnement synchrotron. L'utilisation systématique du synchrotron pour évaluer le risque du recyclage d'un PRO n'est pas envisageable. Il est donc intéressant de déterminer si l'on peut observer des tendances générales par rapport à la spéciation du Zn dans les PRO selon leur type et le traitement subi, en particulier la méthanisation.

### **2.3. Mise en évidence de ZnS dans les digestats**




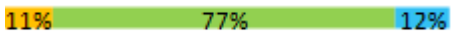
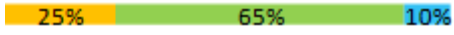
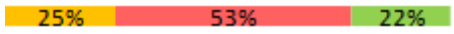









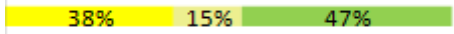
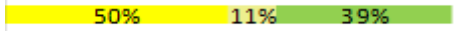
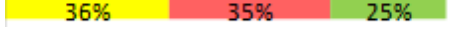



Plusieurs études ont mis en évidence la présence de ZnS dans les digestats avec la technique de l'EXAFS. Kim *et al.* (2014) ont identifié des ZnS dans des boues d'épuration ayant subi un traitement anaérobie. Ces ZnS présentent des tailles de domaine de cohérence de 2,5 à 7,5 nm et ont été observés sous forme d'agrégats sphériques de 160 nm associés à de la matière organique par microscopie électronique à transmission. La caractérisation de la spéciation du Zn par EXAFS révèle que les nano-ZnS représentent environ 75% du Zn total. Le Zn est également présent sous forme de Zn-phosphate et Zn-oxydes de fer. Legros *et al.* (2017) ont étudié l'effet de la méthanisation sur la spéciation du Zn dans des PRO variés (lisiers de porcs, fraction fine de déchets municipaux, boues de STEP) méthanisés au laboratoire en conditions contrôlées. Ils ont également identifié par EXAFS des sulfures de Zn de taille nanométrique dans quelques PRO bruts et digestats et montrent que la méthanisation augmente la proportion de nano-ZnS. La proportion de Zn sous forme nano-ZnS, 0 à 44% dans les digestats, est cependant plus faible que dans l'étude de Kim *et al.* (2014).






Le devenir du Zn, présent sous différentes formes initiales, après méthanisation de boues de STEP a été étudié par Lombi *et al.* (2012). Un déchet contrôle, un déchet avec ajout de chlorure de Zn ( $\text{ZnCl}_2$ ) et trois déchets avec ajouts de trois types de nano-ZnO différentes ont été caractérisés par spectroscopie d'absorption des rayons X (XAS) au seuil K du Zn. Le pourcentage de Zn présent sous forme de sulfure après 30 jours de digestion anaérobie varie entre 67 et 96 % contre 34 à 55% au premier jour du traitement. Le reste du Zn est sous forme de d'hopéite ( $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ ) et Zn complexé à un groupement thiol (Lombi *et al.*, 2012). On remarque une sulfuration du Zn au cours du traitement, la




proportion de ZnS augmente dès les 3 premières heures de méthanisation. Selon le type de nano-ZnO, la disparition de la phase ZnO dure de 1 à 10 jours (Lombi *et al.*, 2012).

Ma *et al.* (2014) ont également étudié le devenir des nano-ZnO dans un PRO après méthanisation et concluent que quel que soit la forme initiale du Zn, la spéciation finale dépend du potentiel redox. En effet, dans les PRO traités par voie anaérobie, la spéciation dominante du Zn est ZnS. Ces résultats sont en accord avec ceux de Donner *et al.* (2011) qui observent que les sulfures de Zn représentent environ 45% du Zn total présents dans les PRO traités par voie anaérobie. Le Zn est aussi présent sous forme de Zn-phosphate, de Zn complexé à un groupement thiol et de Zn sorbé aux oxydes de fer. Les études de Nagoshi *et al.* (2005) et de Donner *et al.* (2013) confirment la présence de ZnS dans les digestats. Les différents résultats de spéciation du Zn dans les PRO selon le traitement subi que nous venons de décrire sont résumés dans le Tableau 5.

Tableau 5 : Spéciation du Zn dans les PRO selon leur type et le traitement subi, données extraites de différentes études ; 1 : (Kim et al., 2014) ; 2 : (Legros et al., 2017) ; 3 : (Ma et al., 2014) ; 4 : (Lombi et al., 2012) ; 5 : (Donner et al., 2011) ; 6 : (Donner et al., 2013)

Etude	Type de PRO	Traitement	Spéciation du Zn
1	Boue de STEP	Méthanisation sur site	
2	Lisier de porc	PRO brut	
		Méthanisation échelle labo	
	Fraction fine de déchets municipaux	PRO brut	
		Méthanisation échelle labo	
	Boues de STEP	PRO brut	
3	Boues de STEP	Méthanisation échelle labo	
		PRO brut	
		Méthanisation échelle labo	
	Boues de STEP	PRO brut	
		Méthanisation pilote 150 L	
		Compostage labo <sup>1</sup>	
4	Boues de STEP mélange boues primaires et secondaires	PRO brut	
		Méthanisation échelle labo (2L)	
		Compostage échelle labo 2 mois	
5	Boues de STEP à la fin du traitement secondaire	PRO Brut 1	
		PRO Brut 2	
		PRO Brut 3	
		PRO Brut 3 composté sur site	
6	Boues de STEP mélange de boues primaires et secondaires	Méthanisation échelle labo (2L)	
		Compostage échelle labo 3 mois	

 Nano-ZnS   
 ZnS   
 Zn-Thiol   
 Zn-Phosphate   
 Zn sorbé aux oxydes de Fer

 Zn-citrate   
 Zn-Malate   
 Zn-phosphate ou Zn sorbé aux oxydes de Fer

La présence de ZnS peut s'expliquer par les conditions lors du procédé de méthanisation qui sont propices à la précipitation de sulfures de métaux. En effet, les

<sup>1</sup> 50°C à l'étuve pendant 3 semaines

digesteurs de méthanisation contiennent une population microbienne variée dont des bactéries qui ne contribuent pas au procédé de méthanisation. En conditions anaérobies et en présence de sulfates ( $\text{SO}_4^{2-}$ ), de sulfites ( $\text{SO}_3^{2-}$ ) ou de thiosulfate ( $\text{S}_2\text{O}_3^{2-}$ ), on peut trouver des bactéries sulfato-réductrices (BSR). Ces bactéries utilisent comme substrat l'acétate, l' $\text{H}_2$  et les composés intermédiaires du procédé de méthanisation pour produire du sulfure d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{S}$ ) (Van Lier *et al.*, 2008). La présence de soufre réduit ( $\text{HS}^-$ ,  $\text{H}_2\text{S}$ ) dans les digesteurs a pour conséquence de précipiter les métaux (chalcophiles en particulier) en sulfures de métaux qui ont une constante de solubilité faible (Fermoso *et al.*, 2015). L'augmentation de pH durant la méthanisation est aussi un facteur qui réduit la solubilité des métaux dans la matrice, ce qui favorise la précipitation des métaux en sulfures, carbonates et phosphates (Möller et Müller, 2012). De plus, il y a de nombreux composés organiques susceptibles d'interagir avec les métaux dans le digesteur tels que les parois cellulaires, les substances polymériques extracellulaires ou encore les composés organiques avec un groupement thiol. Notamment, les composés organiques dissous soufrés peuvent représenter jusqu'à 30% des molécules organiques dissoutes présentes dans les digesteurs de méthanisation (Fermoso *et al.*, 2015).

## **2.4. Changement de spéciation durant le traitement aérobie : mise en évidence de la réactivité des ZnS formés dans les PRO**

### **2.4.1. Spéciation du Zn dans les PRO traités par voie aérobie**

Dans les PRO ayant subi un traitement aérobie, la spéciation du Zn a changé par rapport à celle dans le PRO avant traitement aérobie. La proportion de sulfures est beaucoup moins importante que dans les digestats. Pour les boues de STEP, la spéciation du Zn dominante est le Zn sorbé sur des oxy-hydroxydes de fer et l'hopéite ( $\text{Zn}_3(\text{PO}_4)_2$ ) après un stockage en andains pendant 6 à 24 mois (Donner *et al.*, 2011) ou après 2 à 3 mois de cycles humidification/séchage pour simuler un compostage en laboratoire (Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013).

Ces études ont appliqué le traitement aérobie à des digestats contenant une majorité de Zn sous forme de ZnS. Dans tous les cas on observe une baisse drastique de la proportion de Zn sous forme de sulfure:

- 36% de ZnS à 0% après 6 à 24 mois de stockage en andains (Donner *et al.*, 2011),
- 67-96% de ZnS à 0% en 2 mois de compostage simulé au laboratoire (Lombi *et al.*, 2012),
- 27-70% ZnS (sphalérite + wurtzite) à 26-30% en 3 mois compostage simulé au laboratoire (Donner *et al.*, 2013).

On observe une disparition totale soit de la phase ZnS ou de la phase Zn complexé à un groupement thiol: le Zn initialement présent sous ces formes a tendance à être sorbé sur les oxy-hydroxydes de fer ou à précipiter sous forme de phosphate de Zn pendant le traitement aérobique. Cependant, au terme du traitement aérobique, il reste toujours une proportion minoritaire (20-30%) de ZnS (Donner *et al.*, 2013) ou de Zn complexé à un groupement thiol (Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012). Ces résultats sont également résumés dans le Tableau 5.

#### **2.4.2. Transformation des ZnS : cinétique rapide**

La cinétique de transformation des ZnS formés dans les PRO (quelques mois) est cohérente avec ce qui a été observé pour des ZnS amorphes formés dans les sédiments de la Seine. En effet, les ZnS amorphes identifiés dans les sédiments prélevés et stockés de façon anoxique se transforment pendant l'étape de filtration et de séchage en conditions oxygènes (Priadi *et al.*, 2012). De même, les ZnS présents dans les sédiments anoxiques de l'Illinois se dissolvent dès deux jours de resuspension du sédiment en conditions oxygènes (Xie *et al.*, 2019). Cependant, ces cinétiques sont plus rapides que ce qui a été observé pour d'autres types de ZnS.

Des sédiments riches en Zn ont été collectés dans le Nord de la France, stockés en pot dans une serre avec un arrosage quotidien pendant deux ans. La caractérisation des 19 sédiments révèle que les sulfures de Zn représentent environ 50 % du Zn total, soit 3400 mg/kg de ZnS, ce qui suggère une certaine stabilité des ZnS dans les sédiments bruts (Panfili *et al.*, 2005). De même, Sukola *et al.* (2005) montrent que 30 % de nanoparticules de ZnS ont persisté à 100 jours d'oxydation forcée dans une suspension.

Dans le sol, les ZnS de taille macroscopiques sont encore plus stables. En effet, Robson *et al.* (2014) ont déterminé la cinétique de dissolution de la sphalérite dans un sol tempéré et dans un sol tropical. La sphalérite qui provient d'une collection privée (Richard Tayler Minerals) a été caractérisée par microscopie électronique à balayage à dispersion d'énergie (SEM-EDS). Les particules sont composées de ZnS (Zn 1.01 S 0.99) avec 0.3% de fer et 0.9 % de cadmium. Le cristal macroscopique a été broyé et les particules mesurent moins de 63 µm. Les cinétiques de dissolution sont de 1,2% et 0,6 %/an respectivement pour un apport en sphalérite sur le sol de 1000 mg/kg.

Des ZnS commerciaux de 25 à 40 nm de taille de domaine de cohérence ont été apportés dans 4 sols différents (Voegelin *et al.*, 2011). Deux et quatre ans plus tard, une caractérisation du sol par EXAFS permet de montrer que le Zn est présent sous 5 formes différentes : Zn-hydroxydes double lamellaires (HDL), Zn sorbé sur la couche octaédrique de phyllosilicates, Zn en coordination octaédrique (représenté par du  $Zn^{2+}$  aqueux) ou tétraédrique (représenté par Zn sorbé sur la ferrihydrite) sorbé ou adsorbé sur les constituants du sol et ZnS. La proportion du Zn sous forme de ZnS dans les 4 sols après 2 ans est comprise entre 24 et 93 %, puis entre 3 et 74 % après 4 ans. Cette cinétique de transformation (supérieure à 4 années) est beaucoup plus lente que les 2 mois pour la

transformation totale des ZnS dans un PRO par Lombi *et al.* (2012) ou les 14 jours pour la transformation totale des ZnS des sédiments de l'Illinois (Xie *et al.*, 2019).

Selon les différences expérimentales entre les études de Voegelin *et al.* (2011) et de Lombi *et al.* (2012) et Xie *et al.* (2019), nous ne savons pas si cette différence de réactivité des ZnS s'explique par le fait que:

- les ZnS ont des propriétés intrinsèques différentes, par exemple la taille qui peut être influencée par les conditions de formation des ZnS et/ou
- le milieu dans lequel les ZnS évoluent (sol ou déchet/sédiment) a une influence sur leur transformation.

Pour conclure, d'après ces différentes études, la proportion de Zn sous forme de ZnS dans les digestats est très variable (0 à 98%). Pour l'instant, les paramètres ayant une influence sur la spéciation du Zn, et notamment la proportion de sulfures, dans le digestat ne sont pas identifiés. Même si toutes ces études utilisent l'EXAFS pour déterminer la spéciation du Zn dans le digestat, il est difficile de comparer les différents résultats obtenus sur des PRO de différentes origines (agricoles, urbaines), traités à des échelles différentes (sur site industriel, au laboratoire) et ayant subi une préparation d'échantillon différente. De plus, les études les plus récentes (2014, 2017) identifient les ZnS sous forme de nanoparticules. Par conséquent, nous nous demandons si la taille nanoparticulaire des ZnS formés dans les PRO est systématique.

**Cette partie met en évidence la nécessité d'établir des tendances générales par rapport à l'influence de la méthanisation sur la spéciation du Zn dans les PRO**

L'absence ou quasi-absence de ZnS après compostage des digestats soulève la question de la réactivité de ces ZnS formés pendant le traitement des PRO.

**Pourquoi les ZnS se formant dans les PRO se transforment plus vite que d'autres ZnS ?**

La taille nanométrique des ZnS dans les digestats mise en évidence dans deux études (Kim *et al.*, 2014; Legros *et al.*, 2017) pourrait expliquer la transformation rapide lors du compostage. Dans la partie suivante, nous intéressons donc aux mécanismes de formation des nano-ZnS ainsi qu'aux conditions présentes lors de la méthanisation qui pourraient avoir une influence sur les caractéristiques des nano-ZnS formés.

### 3. Formation des nano-ZnS

Premièrement, les bases théoriques de la nucléation et de la croissance cristalline sont résumées pour mieux comprendre la formation des ZnS et les facteurs pouvant influencer

leurs caractéristiques. Puis, les différents mécanismes de formation (abiotique et biotique) des nano-ZnS sont détaillés. Finalement, les différents composés potentiellement présents dans un digesteur de méthanisation et ayant une influence sur les caractéristiques des nano-ZnS seront discutés: les microorganismes et les molécules organiques.

### 3.1. Généralités : Nucléation et croissance cristalline

La cristallisation est une transition de phase par laquelle la matière est transformée d'un état de haute énergie dans un état solvaté à un état de plus faible énergie sous forme de cristal. Les caractéristiques du cristal (par exemples sa phase, forme, sa cinétique de croissance) sont contrôlées par l'état énergétique du système (De Yoreo et Vekilov, 2003).

C'est le fait que l'énergie libre de la solution initiale soit plus importante que la somme des énergies libres de la phase cristalline finale et de la solution finale qui provoque cette transformation de phase (Gibbs, 1878). En d'autres termes, c'est lorsque le produit des activités des réactifs (PA) est supérieur au produit des activités de ces réactifs à l'équilibre (produit de solubilité :  $K_{sp}$ ). La force motrice pour la cristallisation est contrôlée par la déviation de potentiel chimique entre la solution et la nouvelle phase formée,  $\Delta\mu$  (De Yoreo et Vekilov, 2003):

$$\Delta\mu = k_B T \ln \alpha$$

$$\alpha = \ln(PA/K_{sp})$$

Avec:

$k_B$ : la constante de Boltzmann

T : la température

$\alpha$ : l'indice de sursaturation.

La nucléation correspond à la formation d'embryons de la nouvelle phase, appelés nuclei, au sein du volume de l'ancienne phase et dépend de la stabilité de l'ancienne phase. La nucléation nécessite le passage d'une barrière d'enthalpie libre (Kashchiev, 2000). L'enthalpie libre de nucléation totale  $\Delta G$  est la somme d'une contribution volumique,  $\Delta G_{bulk}$ , et d'une contribution surfacique des particules,  $\Delta G_s$ . Ces deux termes sont proportionnels au rayon du nucleus formé:

$$\Delta G = -\Delta G_{bulk} + \Delta G_s$$

$$\Delta G = \frac{-4\pi}{3} r^3 \Delta g + 4\pi r^2 \sigma$$

Avec

r : rayon du nucleus

$\Delta g$  : variation d'enthalpie libre par unité de volume du nucleus



$\sigma$ : énergie de surface (Benning et Waychunas, 2008).

Il existe un rayon critique pour lequel l'enthalpie libre de nucléation atteint un maximum, cela correspond au rayon du noyau critique,  $r_c$  (Figure 5). Pour  $r < r_c$ , le noyau est instable car le nombre élevé d'atomes à la surface par rapport au nombre total d'atomes du noyau déstabilise le noyau qui va donc se dissoudre. Puis, à partir d'un rayon  $r_c$ , l'énergie consommée par la formation de la particule "bulk" (c'est à dire les atomes qui ne sont pas à la surface) devient suffisamment importante par rapport à l'enthalpie libre de surface: le noyau est stable et la croissance est thermodynamiquement favorisée (Figure 5).

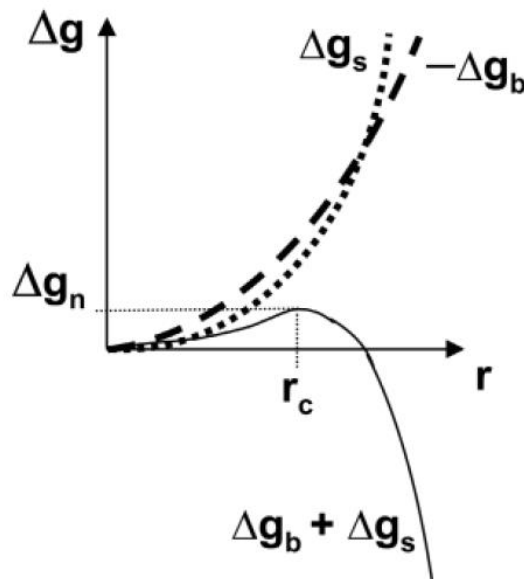


Figure 5 : représentation de  $-\Delta G_b$ , de  $\Delta G_s$  en fonction du rayon du noyau, de l'enthalpie libre totale de nucléation en fonction du rayon du noyau, Le maximum d'enthalpie libre totale ( $\Delta G_n$ ) correspond au rayon du noyau critique (De Yoreo et Vekilov, 2003)

La présence de molécules organiques ayant une affinité pour la surface de la phase solide formée lors de la nucléation-croissance peut diminuer la contribution surfacique de l'enthalpie libre diminuant ainsi la taille du rayon critique et limitant la croissance des particules. L'adsorption de molécules sur une face spécifique du cristal diminue l'énergie de surface de la face couverte et inhibe la croissance de cette face spécifiquement, ce qui permet de contrôler la forme d'un cristal (Meldrum et Cölfen, 2008).

La surface imparfaite d'un cristal sur laquelle les atomes vont s'attacher lors de la croissance cristalline est décrite sur la Figure 6: elle est composée de régions planes avec des couches incomplètes qui forment des marches. Les marches incomplètes forment des nœuds qui sont des sites d'attachement préférentiels pour les molécules (sites de haute énergie) (De Yoreo et Vekilov, 2003). Il n'est pas nécessaire de recouvrir toute la surface du noyau pour bloquer la croissance. En effet, l'adsorption de molécules sur les marches et nœuds qui sont des sites de croissance préférentiels peut bloquer la croissance de toute la surface avec de faibles quantités d'additifs (Meldrum et Cölfen, 2008). Dans le cas de

nanoparticules, on peut visualiser la surface comme une surface continue de défauts contenant des nœuds, des marches, des lacunes ou des îlots, ce qui explique en partie la grande réactivité de surface de ces objets.

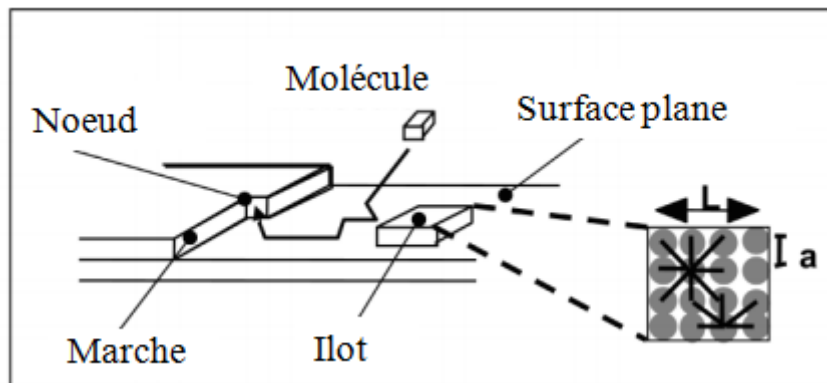
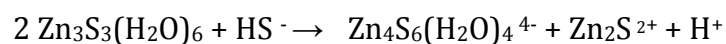


Figure 6 : Représentation de la surface d'un cristal et des sites de croissance, (De Yoreo et Vekilov, 2003)

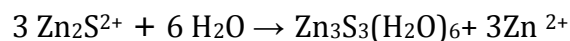
## 3.2. Formation des nano-ZnS

### 3.2.1. Précipitation abiotique

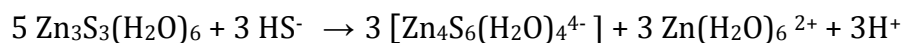
Les sulfures de Zn existent sous deux formes cristallines: la forme cubique appelée la sphalérite et la forme hexagonale appelée la wurtzite. Les ions  $\text{Zn}^{2+}$  et  $\text{S}^{2-}$  s'associent pour former des clusters  $\text{Zn}_3\text{S}_3(\text{H}_2\text{O})_6$ . Puis 2 clusters neutres se condensent et forment un cluster  $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4+}$  selon l'équation suivante (Luther III *et al.*, 1999):



Le complexe  $\text{Zn}_2\text{S}^{2+}$  se réarrange selon l'équation :



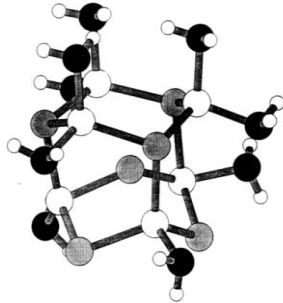
Le bilan de ces équations est le suivant :



Les clusters  $\text{Zn}_3\text{S}_3(\text{H}_2\text{O})_6$  peuvent également se condenser pour former  $\text{Zn}_6\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_9$ . La conformation de cluster  $\text{Zn}_6\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_9$  est celle que l'on retrouve dans la wurtzite (Figure 7a) tandis que la conformation du cluster  $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4+}$  est celle que l'on trouve dans la sphalérite (Figure 7b). Statistiquement, il est plus difficile d'avoir un empilement complet de deux clusters neutres  $\text{Zn}_3\text{S}_3$  (de type wurtzite) qu'un empilement partiel tel que celui observé lors de la condensation de  $\text{Zn}_4\text{S}_6$  et  $\text{Zn}_3\text{S}_3$  (de type sphalérite) (Luther III *et al.*, 1999). En effet, dans des conditions environnementales, c'est la forme cubique sphalérite qui est la plus favorable (Zhang *et al.*, 2006). Ces clusters initiaux ( $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4+}$ ) sont sous forme de précipités amorphes qui vont développer un ordre cristallin au cours de

leur croissance qui se fait par l'association de  $\text{Zn}_3\text{S}_3$  et  $\text{Zn}_4\text{S}_6^{4-}$  selon le réseau cristallin de la sphalérite (Luther III *et al.*, 1999).

a)



b)

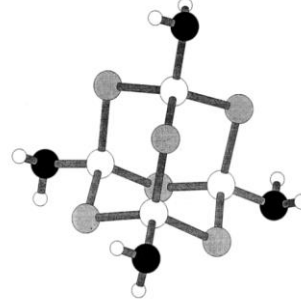


Figure 7 : Structure des clusters (a)  $\text{Zn}_6\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_9$  et (b)  $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4-}$ , les sphères noires et grises représentent respectivement les atomes d'oxygène et de soufre ; les grandes sphères blanches représentent les atomes de zinc et les petites sphères blanches représentent les atomes d'hydrogène, (Luther III *et al.*, 1999)

En synthétisant des nanoparticules de ZnS, Zhang *et al.* (2006) ont identifié des paramètres qui influent sur l'empilement de différentes phases cristallines. Un pH basique favorise la formation de ZnS de type sphalérite tandis que les ZnS synthétisés dans une solution à pH 6.6 sont constitués de sphalérite et de wurtzite. Une augmentation de la température (80- 100°C), un excès de Zn ou de basses concentrations en réactifs de Zn et soufre favorisent la formation de wurtzite. Le temps de réaction n'a pas d'influence sur la nature des phases cristallines : cette caractéristique est déterminée dès les premiers stades de la cristallisation. Ces résultats sont en accord avec la formation de clusters expliquée précédemment car l'excès de soufre favorise la formation de clusters  $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4-}$  donc la formation de sphalérite. Au contraire, lorsque le Zn est présent en excès, il réagit avec les clusters  $\text{Zn}_4\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})_4^{4-}$  chargés négativement pour former  $\text{Zn}_6\text{S}_6(\text{H}_2\text{O})$ , caractéristique de la wurtzite (Zhang *et al.*, 2006).

Les calculs de dynamique moléculaire de Khalkhali *et al.* (2016) montrent que plus les nano-ZnS sont petites, moins la structure est similaire à celle des ZnS bulk, c'est-à-dire moins cristalline. Pour une taille de 1 nm, la structure des nano-ZnS n'est pas cristallisée, même en présence d'eau. La présence d'eau à la surface des nano-ZnS augmente la cristallinité des nano-ZnS pour les nanoparticules ayant une taille égale ou supérieure à 2 nm. Donc l'effet de l'eau à la surface des nano-ZnS dépend de la taille des nano-ZnS. Dans cette étude, la structure à 3 couches des nano-ZnS de taille supérieure à 3 nm est mise en évidence : le cœur cristallin (atomes avec un nombre de coordination de 4 et un arrangement périodique), la surface avec des atomes sous-coordonnés et une interface relativement épaisse entre le cœur cristallin et la surface. Cette interface est caractérisée par une structure déformée composée d'atomes qui ont un indice de coordination de 4 (Khalkhali *et al.*, 2016). Pour une taille inférieure à 2 nm, il n'y a pas de cœur cristallin (Khalkhali *et al.*, 2015).

### 3.2.2. Précipitation biogénique

Le Zn précipite sous forme de sulfures de Zn en présence de sulfates et de bactéries sulfato-réductrices (BSR). Les BSR réduisent les sulfates et le Zn précipite avec le soufre réduit biogénique. Par exemple, *Serratia nematodiphila*, une souche de BSR, a été utilisée pour synthétiser des nano-ZnS (Malarkodi et Annadurai, 2013). Plusieurs études sur la précipitation de nano-ZnS en présence de *Desulfovibrio sulfuricans* ont été publiées (Peltier *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). La synthèse biogénique de ZnS par des bactéries n'appartenant pas à la famille des sulfato-réductrices est beaucoup moins étudiée. Bai *et al.* (2006) ont synthétisé des nano-ZnS avec la bactérie pourpre non sulfureuse *Rhodobacter sphaeroides*. Les conditions de la méthanisation ne sont pas favorables à la présence de bactéries photosynthétiques telles que *Rhodobacter sphaeroides*. Cependant, elles sont favorables à la présence de bactéries sulfato-réductrices, c'est pourquoi l'interaction entre ZnS et des bactéries de cette famille sont discutées par la suite.

Plusieurs auteurs ont caractérisé des sulfures de Zn au sein de biofilms dominés par des BSR (environ 40% des bactéries du biofilm) (Labrenz *et al.*, 2000; Moreau *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2007). La plupart de ces BSR sont entourées par des sulfures de Zn de taille nanoparticulaire (3-5 nm) présents sous forme de particules individuelles, regroupés en agrégats de 10 à 20 nm ou regroupés sous forme de sphéroïdes de 1 à 5  $\mu\text{m}$ . Ces sphéroïdes sont associés aux polymères organiques présents dans le biofilm. On observe des ZnS autour mais également à l'intérieur des parois cellulaires. Les particules de ZnS comprennent des défauts cristallins, notamment des défauts d'empilement sur la face (111) du cristal : il s'agit d'un empilement de phases sphalérite et wurtzite intercalées (Figure 8) (Moreau *et al.*, 2004).

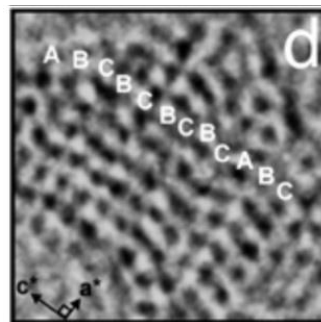


Figure 8 : Nanocristal désordonné caractérisé par MET avec des séquences d'empilement variant entre cubique (ABC, sphalérite) et hexagonale (BC, wurtzite)(Moreau *et al.*, 2004).

Une étude complémentaire a caractérisé la matière organique associée aux nano-ZnS dans ce même biofilm. Au sein des sphéroïdes présents dans le biofilm, les nano-ZnS et des composés azotés sont co-localisés d'après les images obtenues par spectroscopie de masse à ionisation secondaire à l'échelle nanométrique (nanoSIMS). L'azote est de type organique. D'après des résultats de spectroscopie infrarouge à Transformée de Fourier utilisant le rayonnement synchrotron (SR-FTIR), les absorptions de type amide II et amide I sont associées aux régions du biofilm riches en ZnS: ces composés sont caractéristiques d'acides aminés dérivés de protéines ou de polypeptides. Une analyse par

chromatographie sur gel montre qu'une protéine de poids moléculaire 37kDa est associée aux sphéroïdes de ZnS. Parmi plusieurs acides aminés testés, c'est la cystéine qui réagit le plus avec les ZnS et qui favorise leur agrégation après 5 jours (Moreau *et al.*, 2007).

### **3.3. Facteurs pouvant influencer les propriétés structurales des nano-ZnS lors de leur formation**

#### **3.3.1. Influence des microorganismes**

Peltier *et al.* (2011) et Xu *et al.* (2016) ont comparé des nano-ZnS biogéniques, produits avec des bactéries sulfato-réductrices (*Desulfovibrio sulfuricans*) à des nano-ZnS formés dans un milieu abiotique. La première étude montre par EXAFS que les particules biogéniques ont un environnement local plus proche de celui de la sphalérite que les ZnS abiotiques en termes de nombre d'atomes voisins. Xu *et al.* (2016) montrent par diffraction des rayons X que les domaines de cohérence cristalline des particules biogéniques sont plus grandes (6, 4 et 4 nm dans les directions (111), (220) et (311)) que les particules abiotiques (2, 1 et 2 nm dans les directions (111), (220) et (311)). Les nano-ZnS abiotiques ont les mêmes caractéristiques que la synthèse soit faite par ajout de soufre à un débit de 0.45 mmol/heure ou par diffusion à travers une membrane de dialyse mimant l'apport de sulfures par des bactéries. De plus, les ZnS biogéniques s'agrègent moins que les ZnS abiotiques.

Il est délicat de comparer une synthèse abiotique avec une synthèse biogénique. En effet, lors de la synthèse biogénique, le soufre réduit est produit de manière progressive par la respiration des sulfates. L'indice de saturation est donc plus faible que pour la synthèse abiotique pour laquelle les réactifs sont mélangés en une seule fois comme dans le cas de l'étude de Peltier *et al.* (2011). Un indice de saturation élevé favorise la nucléation de nombreux nuclei limitant ainsi la croissance de grosses particules. Ainsi, la différence de sursaturation entre une synthèse biotique et abiotique pourrait expliquer la différence de taille (Mersmann, 1999). Xu *et al.* (2016) n'ont pas observé de différence structurale entre les deux nano-ZnS abiotiques synthétisées avec deux débits différents d'ajout du soufre. Cependant, il est difficile de savoir si ces différences structurales entre nano-ZnS biotiques et abiotiques sont dues au taux d'ajout du soufre car il n'est pas quantifié dans le cas de la diffusion ni dans le cas de la réduction des sulfates par les bactéries.

Une autre explication possible de la différence de structure entre nano-ZnS biotiques et abiotiques serait que les éléments présents dans le milieu des bactéries (présents dans le milieu de culture initial ou métabolites produits) favorisent la croissance cristalline. En effet, si les ligands se fixent aux ions  $\text{Zn}^{2+}$ , la concentration en  $\text{Zn}^{2+}$  dissous baisse et l'indice de saturation du système baisse. La croissance cristalline est favorisée lorsque l'indice de saturation est faible donc les particules obtenues sont plus grandes (Mersmann, 1999).

De plus, les ZnS biogéniques étudiées par Xu *et al.* (2016) présentent des défauts cristallins (macles et défauts d'empilement, Figure 9 ). Ces défauts sont présents le long de la face (111) des particules où l'on observe une structure hexagonale. Il s'agit de la seule face polaire de la sphalérite donc la face susceptible d'interagir avec des composés polaires tels que l'eau, la tête des phospholipides ou certains acides aminés (par exemples : cystéine, sérine, acide glutamique, histidine...)(Xu *et al.*, 2016). Ces résultats suggèrent une troisième possibilité pour expliquer la différence entre les ZnS biogéniques et abiotiques : les éléments présents dans le milieu de culture des BSR pourraient également avoir une influence sur la structure des ZnS par une liaison de surface.

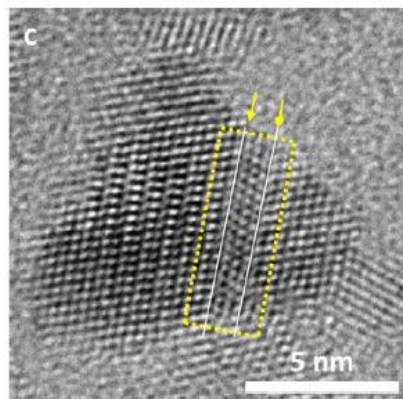


Figure 9 : Image de microscopie électronique à transmission de nano-ZnS biogéniques qui montre des défauts cristallins de type macles dans l'encadré jaune, (Xu *et al.*, 2016).

Eskelsen *et al.* (2018) ont synthétisé des nano-ZnS biogéniques avec *Thermoanaerobacter* sp. X513 et les ont comparées à des nano-ZnS abiotiques. La comparaison de taille de particules est cohérente avec les résultats de Xu *et al.* (2016): les particules biogéniques sont plus grandes (8 nm) que les particules abiotiques (5 nm) d'après les images de microscopie électronique à transmission. Les auteurs observent la présence de carbone au sein des agrégats de particules biogéniques et pas dans les nano-ZnS abiotiques et suggèrent la présence de métabolites microbiens. Les particules biogéniques présentent des défauts de types macles le long de la face (111). Ce résultat, observé sur seulement 1% des particules biogéniques, est sous-estimé car les particules n'étaient pas orientées de manière à pouvoir observer les défauts de type macles le long de la face (111) (Eskelsen *et al.*, 2018).

### 3.3.2. Molécules organiques

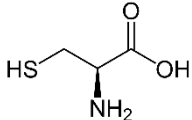
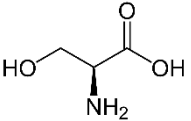
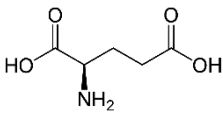
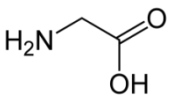
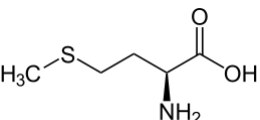
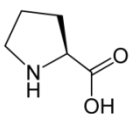
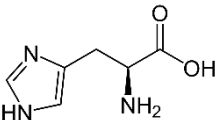
Plusieurs études ont caractérisé l'influence de molécules organiques sur l'agrégation et la taille des nano-ZnS. Par exemple, les nano-ZnS s'agrègent moins avec des matières organiques extraites d'eau de rivière présentes dans le milieu avant leur précipitation : la taille des agrégats de nano-ZnS est ainsi divisée par quatre (Lau et Hsu-Kim, 2008). La cinétique d'agrégation varie en fonction du type de matière organique et de sa concentration. La cinétique d'agrégation diminue avec l'augmentation du taux de carbone aromatique et le poids moléculaire des acides humiques ou fulviques (Deonarine *et al.*,

2011). Cela suggère un effet stérique des molécules organiques qui limitent l'agrégation des ZnS.

Villa-Gomez *et al.* (2014) montrent une interaction différente entre le cuivre (Cu) et le Zn et la matière organique présente dans un milieu contenant du soufre biogénique selon le pH. L'interaction est plus forte à pH 5 avec les composés de types humiques et fulviques, ce qui concorde avec l'observation de ZnS mieux cristallisés qu'à pH 3 et 7 par microscopie électronique à balayage et par EXAFS au seuil K du Zn (Villa-Gomez *et al.*, 2014). Les auteurs supposent qu'une baisse de sursaturation pourrait être favorisée à pH 5, ce qui induirait la formation de ZnS mieux cristallisés. En effet, le pH qui contrôle l'ionisation des groupements fonctionnels de la matière organique et pourrait donc contrôler l'affinité de la matière organique dissoute (MOD) pour le Zn et le Cu. Puis, la formation de complexes Zn-MOD baisserait l'indice de saturation du système.

Les acides aminés sont les constituants des protéines synthétisées par les bactéries. Les acides aminés ont des groupements fonctionnels et des constantes de dissociation qui varient en fonction de leur nature, ils ont donc chacun une affinité propre avec le Zn (constantes de stabilité des complexes Zn-acides aminés, log K, dans le Tableau 6).

Tableau 6 : Structures et constantes de stabilité des complexes Zn avec certains acides aminés, (Smith et Martell, 2004 )

Acide aminé	Structure	Log K à 25 °C et I=0,1M
Cystéine		9,11
Sérine		4,60
Acide Glutamique		4,49
Glycine		4,96
Méthionine		4,38
Proline		5,27
Histidine		6,51

La cystéine est l'acide aminé qui a l'affinité la plus forte pour le Zn. La cystéine est une brique de nombreuses protéines telles que les phytochélatines (synthétisée par les plantes vasculaires, les champignons, les levures et les microalgues) et les métallothionéines (synthétisée par les animaux, les plantes et les procaryotes) (Park *et al.*, 2015). La cystéine, présente lors de la précipitation des ZnS, limite fortement l'agrégation des ZnS pendant les premières heures qui suivent leur précipitation (Lau et Hsu-Kim, 2008). L'agrégation est d'autant plus limitée si la concentration en cystéine augmente, si la force ionique diminue ou si le pH augmente (Gondikas *et al.*, 2010; Gondikas *et al.*, 2012). La sérine a très peu d'influence sur l'agrégation des ZnS (Lau et Hsu-Kim, 2008; Gondikas *et al.*, 2010). C'est un acide aminé ayant la même structure que



la cystéine avec un groupement fonctionnel O-H à la place du groupement S-H de la cystéine (Tableau 6). C'est donc par le groupement thiol (S-H) que la cystéine se complexe aux particules de ZnS. Le glutathion (GSH), molécule composée de cystéine, acide glutamique et de glycine, limite également l'agrégation des ZnS (Lau et Hsu-Kim, 2008).

Les études de Gondikas *et al.* (2010) et (2012) montrent que la cystéine limite l'agrégation des ZnS à court terme que la cystéine soit présente pendant ou après la précipitation des ZnS. Cependant, 13 heures après leur formation, les nano-ZnS s'agrègent via les enrobages de cystéine autour des particules (Gondikas *et al.*, 2012). A plus long terme, sur 5 jours, la cystéine favorise l'agrégation des nano-ZnS (Moreau *et al.*, 2007). Il semblerait donc que selon la durée de maturation des nano-ZnS, l'influence des molécules organiques (MO) sur l'état d'agrégation est différente.

Cette interaction MO – ZnS est utilisée pour synthétiser des nanoparticules de ZnS de petite taille utilisées pour dégrader des polluants par photocatalyse. Les composés organiques utilisés sont le glutathion (Bae *et al.*, 1997), la cystéine (Bae et Mehra, 1998) ou l'histidine (Kho *et al.*, 2000; Devi et Negi, 2013). D'après ces études, les molécules organiques contrôlent la taille des nano-ZnS en enrobant la surface. En comparant les études entre elles, les auteurs concluent que c'est en présence de cystéine que les nano-ZnS ont la plus petite taille plutôt qu'en présence de glutathion (Bae et Mehra, 1998). Le but de ces études était d'optimiser la synthèse de nano-ZnS ayant une faible distribution de taille avec une molécule bon marché, telle que la cystéine ou le glutathion. Les auteurs n'ont pas comparé la taille de ces nano-ZnS enrobées de cystéine avec des nano-ZnS synthétisées sans molécule organique. Ces études ne permettent donc pas de conclure rigoureusement à propos de l'effet des molécules organiques sur la taille des nano-ZnS. Les résultats de spectroscopie des RX aux petits angles de Gondikas *et al.* (2012) montrent que la cystéine ne bloque pas la croissance des particules unitaires: plus il y a de cystéine dans le système, et plus les particules unitaires sont grandes lors des premiers stades de précipitation (les 12 premières heures). Les auteurs de cette dernière étude concluent donc que la présence de cystéine favorise la croissance cristalline des particules unitaires de ZnS dans les premières heures de la croissance. Cependant, nous ne savons pas si tous les sites de croissance des ZnS étaient bloqués avec la quantité de cystéine utilisée (rapport molaire Cystéine/Zn de 2). De plus, l'influence de la cystéine sur la taille des particules unitaires de nano-ZnS sur des temps de maturation plus longs n'a pas été étudiée.

Eskelsen *et al.* (2018) ont synthétisé des nano-ZnS abiotiques plus petites en présence d'acétate (3 nm) que sans acétate (5 nm). Le mécanisme suggéré pour expliquer cette différence est que comme l'acétate est une molécule polaire, elle se lie à la surface des nano-ZnS par une face polaire, telle que (111), ce qui stabilise ces faces qui ont une haute énergie de surface et laisse les autres faces avec moins d'énergie exposées (Eskelsen *et al.*, 2018). Cependant, la présence d'acétate n'est pas la seule différence entre les 2 synthèses abiotiques. En effet, la synthèse de nano-ZnS en présence d'acétate est faite en anoxie, avec  $[Zn] = 1 \text{ mol/L}$  et la source de soufre est de l' $H_2S$  biogénique. L'autre synthèse est

faite en présence d'oxygène et  $[Zn] = 0.5 \text{ mmol/L}$  (Eskelsen *et al.*, 2018). Ces différences de protocole pourraient expliquer la différence de tailles observée. Ainsi, l'influence seule de l'acétate sur la taille des nano-ZnS nécessite d'être vérifiée.

En résumé, parmi les facteurs ayant une influence sur les caractéristiques des nano-ZnS lors de leur formation, plusieurs concordent avec les conditions de formation des nano-ZnS dans les PRO pendant la méthanisation : présence de bactéries (sulfato-réductrices) et présence de matière organique. Premièrement plusieurs études observent le même constat : les nano-ZnS biotiques sont plus grandes et mieux cristallisées que les nano-ZnS abiotiques. Cependant, le mécanisme expliquant cette différence n'est pas connu. Puis, l'influence des molécules organiques seules sur les caractéristiques de structure des nano-ZnS nécessite d'être éclairci car les résultats de la littérature se contredisent. En effet, l'une des hypothèses pour expliquer la différence de structure entre les nano-ZnS bio- et abiotiques serait que la présence de molécules organiques dans le milieu biotique ait une influence sur la structure des nano-ZnS. Les paramètres de structure intrinsèques aux particules peuvent contrôler leur réactivité, donc la question suivante est soulevée :

**Quelle est l'influence de molécules organiques, composant le PRO, sur la structure des nano-ZnS ?**

## **4. Facteurs pouvant influencer la réactivité des nano-ZnS**

La réactivité désigne la capacité des particules à réagir avec le milieu extérieur par des réactions de surface principalement (oxydation par exemple). Dans le cadre de la thèse, la réactivité des nano-ZnS dans les PRO désigne leur capacité à réagir avec le milieu extérieur pour se dissoudre et ainsi libérer le Zn qui pourra alors subir d'autres transformations. Au contraire, la stabilité des particules désigne leur capacité à ne pas réagir avec le milieu extérieur et à conserver leur structure et spéciation originales. Afin de comprendre la réactivité importante des ZnS formés lors de la méthanisation, nous proposons par la suite de décrire comment les paramètres structuraux des nano-ZnS (taille, contrainte, défauts cristallins) peuvent contrôler leur réactivité. Puis, nous nous intéresserons aux paramètres extrinsèques (paramètres abiotiques, biotiques tels que les microorganismes et les plantes, ligands potentiels du sol), c'est-à-dire les caractéristiques du milieu dans lequel les nano-ZnS formées se trouvent.

## 4.1. Facteurs intrinsèques

### 4.1.1. Taille

Lorsque la taille d'une particule est inférieure à 10 nm, la fraction d'atomes situés en surface augmente significativement par rapport à la fraction d'atomes de cœur (Figure 10). Autrement dit, la proportion d'atomes avec une coordination non optimale augmente lorsque la taille de la particule diminue. Ces atomes de surface sont susceptibles de réagir avec le milieu extérieur et génèrent un excès d'énergie. L'énergie totale du système augmente donc lorsque la taille de la particule diminue. Cet excès d'énergie peut être minimisé par plusieurs phénomènes: protonation, reconstruction de la surface, changement dans la coordination des sites de surface, déplacement d'atomes, modification des longueurs de liaison ou des angles. Ces effets de surface peuvent perturber la périodicité des atomes (Banfield et Zhang, 2001).

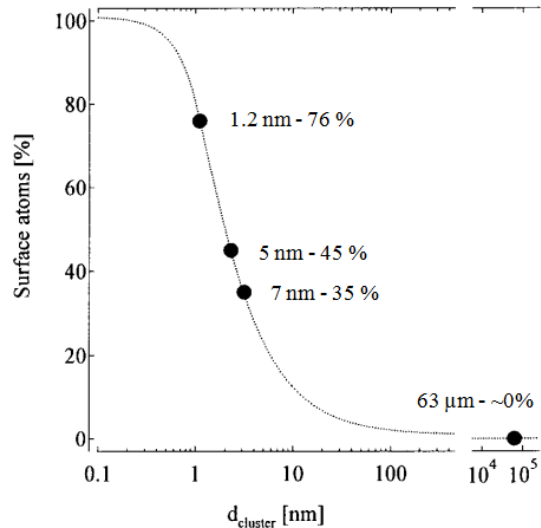


Figure 10 : Pourcentage d'atomes de surface en fonction de la taille de clusters de palladium (Nützenadel et al., 2000)

La taille des particules a un effet sur leur solubilité. L'équation d'Ostwald-Freundlich est une forme modifiée de l'équation de Kelvin qui relie la solubilité d'une particule à son rayon  $r$ :

$$S_r = S_{bulk} \exp\left(\frac{2\gamma V_m}{RT_r}\right)$$

Avec:

$S$ : la solubilité

$R$ : rayon de la particule

$\gamma$ : la tension de surface

$V_m$ : le volume molaire

$R$ : la constante universelle des gaz parfaits

$T$ : la température

Les indices  $r$  et  $bulk$  indiquent la solubilité d'une particule de rayon  $r$  et de l'homologue bulk.

Cependant, l'équation d'Ostwald-Freundlich considère une énergie de surface constante, quelle que soit la taille des particules. Or l'énergie de surface peut dépendre de la taille et de la structure de la surface (défauts de structure, nature des phases présentes à la surface). Les surface des nanoparticules contiennent de nombreux sites à haute énergie (marches, lacunes...), qui sont les sites préférentiels pour le détachement des atomes (Mudunkotuwa et Grassian, 2011).

Par exemple, Zhang *et al.* (2010) ont montré que l'énergie de surface des nano-ZnS est dépendante de leur taille, ce qui contrôle leur dissolution dans un milieu contenant un agent complexant (EDTA). Par ailleurs, les nano-ZnS de forme cubique (sphalérite) ont une structure moins stable que leurs homologues bulk. En effet, la structure sphalérite bulk<sup>1</sup> est stable jusqu'à 1020°C, tandis que les nano-sphalérites se transforment en nano-wurtzite dès 225°C (Huang et Banfield, 2005).

#### 4.1.2. Désordre structural

Pour des nano-ZnS synthétisées ayant une taille de 3.4 nm, une analyse par PDF (Fonction de Distribution de Paires) indique un désordre structural, une perte de la cohérence cristalline sur la couche correspondant à un diamètre compris entre 2 et 3.4 nm et une contraction des distances interatomiques de 1% par rapport aux ZnS bulk (Gilbert *et al.*, 2004). La contraction et le désordre structural affectent les propriétés électroniques des nanoparticules, ce qui peut avoir un effet sur leur réactivité de surface par exemple.

La contrainte appliquée à la surface des nano-ZnS est induite par la sous-coordination des atomes dans la couche de surface (qui crée une tension de surface) et le rayon de courbure des particules. La contraction ou dilatation du réseau cristallin est induite par cette contrainte. Pour la ferrihydrite, une diminution de la taille entre 12 et 2 nm provoque une contrainte anisotrope : une contraction selon un paramètre de maille et une expansion selon un autre paramètre de maille (Michel *et al.*, 2010). Pour les nanoparticules de CdSe, qui ont une structure plus proche des ZnS (sphalérite ou wurtzite), la contraction du réseau cristallin augmente lorsque la taille diminue (Masadeh *et al.*, 2007). Cependant, cette relation entre contrainte et taille n'est pas systématique : aucune contrainte n'a été observée quelle que soit la taille des nanoparticules d'argent entre 6 et 30 nm (Ma *et al.*, 2012). En effet, la contraction du réseau cristallin a généralement été observée pour des particules dont la taille était inférieure à 5 nm. Les nano-ZnS de 3.4 nm présentent une contraction par rapport au bulk (Gilbert *et al.*, 2004), cependant, la dépendance de la contraction par rapport à la taille pour les nano-ZnS n'a

---

<sup>1</sup> Bulk désigne une particule homologue microscopique bien cristallisée par rapport à la une nanoparticule

pas été étudiée. Jiang et al. 2001 démontrent que la contraction  $\varepsilon$  des cristaux cubiques à face centrée est reliée à leur taille  $D$  par la formule suivante :

$$\varepsilon = \pm \frac{14}{3 \left( \frac{T_m}{T} + 6 \right) D} \sqrt{(\kappa D_0 h S_{vib} H_m / (R V_m))}$$

Avec :

$T_m$  : température de fusion (K)

$T$  : température du milieu (K)

$\kappa = \frac{1}{B}$  avec  $B$  le module d'élasticité isostatique

$D_0$  : diamètre pour lequel la particule possède la plupart de ses atomes en surface,  $D_0 = 3h$  pour des particules avec  $h$  le diamètre atomique

$S_{vib}$  : entropie de fusion

$H_m$  : enthalpie de fusion

$R$  : constante des gaz parfaits

$V_m$  : volume molaire

Jiang *et al.* (2001) montrent que ce modèle correspond bien aux résultats expérimentaux obtenus pour des nanoparticules d'or, de cuivre, de platine, d'argent et d'aluminium. Avec les données thermodynamiques correspondant aux ZnS (Li *et al.*, 2008), il est possible de tracer la courbe théorique représentant la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille pour une température de 25°C.

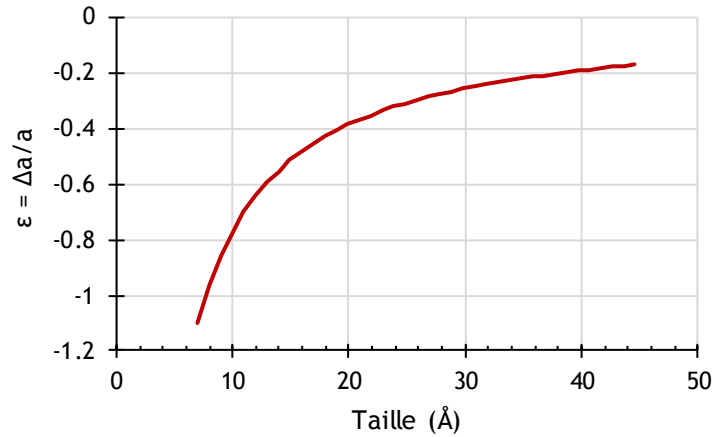


Figure 11 : Courbe théorique de la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille d'après l'équation établie par Jiang et al. (2001) et les données thermodynamiques correspondant aux ZnS d'après Li et al. (2008)

Cependant, il n'existe pas de données expérimentales qui permettent de valider cette tendance pour les nano-ZnS. Or, une contrainte de type contraction du réseau cristallin a une influence sur la réactivité (Mavrikakis *et al.*, 1998). Par exemple, Strasser *et al.* (2010) ont montré que l'activité catalytique des nanoparticules composées de platine et de cuivre de type cœur coquille était augmentée lorsque la contrainte augmente. Les auteurs expliquent ce phénomène par le fait que la compression modifie la structure de la "d-band" et diminue l'énergie d'adsorption des réactifs. De même, Pratt *et al.* (2014) ont

montré que la contrainte dans les nanoparticules de fer favorise leur oxydation qui s'explique par une meilleure conduction des ions. La contrainte peut aussi avoir une influence sur la solubilité comme le prédit l'équation d'Ostwald-Freundlich : si la contrainte augmente alors, l'énergie de surface augmente ainsi que la solubilité.

Des études montrent un relâchement de la contrainte à la surface des nano-ZnS de 3nm, lié à un réarrangement des atomes de surface en présence d'eau (Zhang *et al.*, 2003) ou lors de l'agrégation des nano-ZnS entre elles (Huang *et al.*, 2004). Lors du relâchement de la contrainte, des défauts cristallins peuvent se former au sein des particules (Maree *et al.*, 1987; Jin *et al.*, 2008). D'ailleurs, Eskelsen *et al.* (2018) formulent l'hypothèse que la contrainte des nano-ZnS est plus susceptible d'être relâchée en créant des défauts d'empilement le long de la face (111) plutôt qu'en relâchant l'ensemble de la structure des nano-ZnS. D'après plusieurs études sur d'autres nanoparticules que les ZnS, il est connu que les nanoparticules ayant des défauts de structure à la surface ainsi que des structures amorphes se dissolvent plus vite que les particules ayant une structure de type bulk (Wagner *et al.*, 2014). Par exemple, Echigo *et al.* (2012) démontrent que la présence de défauts de structure à la surface de nanoparticules d'hématite favorise leur dissolution.

L'étude qualitative de la dissolution des nano-ZnS par microscopie de Xu *et al.* (2016) montrent que les nano-ZnS se dissolvent préférentiellement au niveau des défauts de structure, tels que des défauts d'empilement ou des macles (Figure 12). Au contraire, Eskelsen *et al.* (2018) n'ont pas pu voir de dissolution au niveau des défauts de type macles mais ont remarqué que certaines faces rétrécissent plus vite que d'autres. Cette dernière étude a permis de comparer des particules biogéniques et abiotiques: l'énergie de surface calculée d'après la courbe de dissolution est plus importante pour les particules biogéniques (les plus grandes et avec le plus de défauts cristallins) que pour les particules abiotiques, ce qui les rend plus réactives. Ainsi, les défauts cristallins présents au sein de la structure des nano-ZnS biogéniques pourraient favoriser leur dissolution.

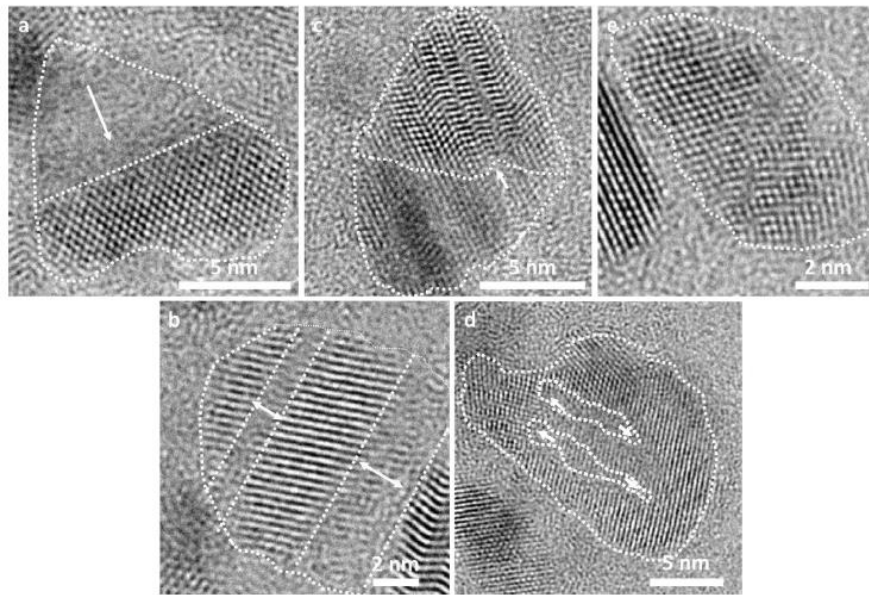


Figure 12 : Images de microscopie électronique à transmission de nano-ZnS biogéniques après 24 heures de dissolution. La morphologie de départ des nano-ZnS et la direction de la dissolution sont indiquées par les pointillés et flèches blanches. (Xu et al., 2016)

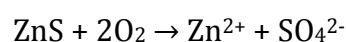
## 4.2. Facteurs extrinsèques

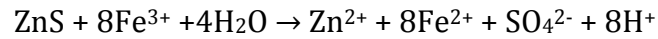
Zhang *et al.* (2003) ont montré que la nature des ligands peut avoir un effet sur la structure cristalline des nano-ZnS (3 nm). En particulier, une nano-ZnS dispersée dans du méthanol a une structure différente que si elle est dispersée dans l'eau. Les liaisons avec l'H<sub>2</sub>O en surface de la nanoparticule engendrent une relaxation de la structure qui était initialement contractée et qui présentait un arrangement d'atomes désordonnés à la surface de la particule. Ainsi, les paramètres extrinsèques ont aussi la capacité d'influencer les paramètres intrinsèques des nano-ZnS.

Des cinétiques de dissolution différentes d'une même nano-ZnS (taille de cristallite 25-40 nm) ont été mesurées dans quatre sols différents (Voegelin *et al.*, 2011). En revanche, Robson *et al.* (2014) ont déterminé deux cinétiques de dissolution du même ordre de grandeur pour la sphalérite microscopique dans un sol tempéré (1,2%/an) et dans un sol tropical (0,6%/an). Il semblerait donc que certains composants du sol influencent la dissolution des ZnS de taille nanoparticulaire. Parmi ceux-ci, il pourrait s'agir de facteurs abiotiques et/ou biotiques telles que les microorganismes ou les plantes ou bien des ligands du sol.

### 4.2.1. Oxydation abiotique des ZnS

La dissolution des ZnS a lieu par une oxydation du soufre, ce qui relargue des ions sulfates (SO<sub>4</sub><sup>2-</sup>). L'oxydation des ZnS peut se faire par l'oxygène dissous ou le fer III :

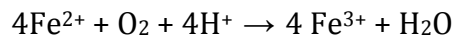




Dans la première équation, l'oxydant est  $\text{O}_2$  tandis que dans la seconde, l'oxydation se fait par la réduction du  $\text{Fe(III)}$  en  $\text{Fe(II)}$ . Heidel *et al.* (2011) ont suivi la composition isotopique de l'oxygène et du soufre lors de la dissolution d'une sphalérite riche en fer. Ils ont mis en évidence un changement de mécanisme de dissolution au cours du temps. Pendant les 20 premiers jours, c'est l' $\text{O}_2$  qui est responsable de l'oxydation car sa composition isotopique est la même que celle des sulfates. Puis, le  $\text{Fe}^{2+}$  relargué par la dissolution de la sphalérite est oxydé en  $\text{Fe}^{3+}$  par l' $\text{O}_2$ . Ensuite, la composition isotopique de l'oxygène des sulfates se rapproche de celle des molécules  $\text{H}_2\text{O}$  ce qui suggère que la dissolution oxydative se fait avec les ions  $\text{Fe}^{3+}$  formés plutôt qu'avec l' $\text{O}_2$  (Heidel *et al.*, 2011). Rath *et al.* (1981) ont montré que lors de la dissolution des  $\text{ZnS}$  dans une solution de chlorure de fer, une couche de soufre élémentaire ( $\text{S}^0$ ), issu de la dissolution de  $\text{ZnS}$ , se forme à la surface des  $\text{ZnS}$ . La dissolution est ensuite limitée car cette couche empêche la diffusion des ions  $\text{Fe(III)}$  vers la surface, capables d'oxyder les  $\text{ZnS}$  (Rath *et al.*, 1981).

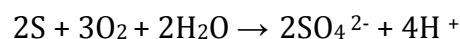
#### 4.2.2. Microorganismes

Les bactéries ferro-oxydantes telles que *Thiobacillus ferrooxidans* ont la particularité d'oxyder les ions ferreux ( $\text{Fe}^{2+}$ ) selon la réaction :



La présence de ce type de bactérie favorise donc la dissolution oxydative de la sphalérite par le fer ferrique ( $\text{Fe}^{3+}$ ), selon l'équation décrite dans le paragraphe 4.2.1. .

Fowler et Crundwell (1999) ont comparé la dissolution de la sphalérite en présence de *Thiobacillus ferrooxidans* et la dissolution par voie chimique en contrôlant le potentiel redox afin d'avoir une concentration en  $\text{Fe}^{3+}$  identique dans les deux systèmes à partir de  $\text{Fe}^{2+}$ . Ils observent que pour une concentration initiale de 1g/L en  $\text{Fe}^{2+}$ , la présence de *Thiobacillus ferrooxidans* n'augmente pas la cinétique de dissolution de la sphalérite. Cependant, pour des milieux plus concentrés, *Thiobacillus ferrooxidans* accélère significativement la dissolution après environ 10 heures de réaction. Les images de microscopie électronique à balayage (MEB) montrent que dans le cas de la dissolution par voie chimique, il y a une couche poreuse de soufre présente autour de la sphalérite. Cette couche limite la diffusion du  $\text{Fe}^{3+}$  et donc la dissolution oxydative. *Thiobacillus ferrooxidans* est capable d'oxyder le soufre présent à la surface de la sphalérite selon la réaction suivante :



La dissolution de cette couche de soufre par *T. ferrooxidans* facilite la diffusion du  $\text{Fe}^{3+}$  vers la surface des  $\text{ZnS}$  (Fowler et Crundwell, 1999). Lors *et al.* (2004) ont également mis en évidence le rôle de bactéries capables d'oxyder le soufre telles que *Acidithiobacillus thiooxidans* lors du relargage de  $\text{Zn}$  présent dans des sédiments anoxiques, certainement



sous forme de ZnS, phase majoritaire du Zn dans des sédiments anoxiques (Isaure *et al.*, 2002; Xie *et al.*, 2019).

#### 4.2.3. Plantes

L'oxydation des ZnS est accélérée significativement par la présence de plantes. Deux plantes tolérantes aux métaux, la fétuque rouge (*Festuca rubra*) et l'agrostide commune (*Argrotis tenuis*), ont été cultivées pendant deux ans dans des sédiments en pots. La caractérisation des sédiments par EXAFS révèle une quasi-absence de sulfures de Zn en fin d'incubation. Dans le sédiment de contrôle non végétalisé, les sulfures représentent 50 % du Zn total. Les ZnS sont donc moins stables en présence de plantes que dans le sédiment sans plante. Plusieurs explications sont proposées. Premièrement, la présence de racines augmente la quantité d'O<sub>2</sub>, capable d'oxyder les ZnS, dans le sédiment. Puis, les plantes exsudent des phytosidérophores (chaînes d'acides aminés courtes). Ce flux de molécules organiques et de nutriments minéraux active le métabolisme des microorganismes, notamment de *thiobacillus sp.* qui accélère la dissolution des ZnS. De plus, les molécules organiques ayant une forte affinité pour le Zn, elles peuvent aussi contrôler la dissolution des ZnS. Le Zn issu de l'oxydation des ZnS se retrouve majoritairement sous la forme de Zn-Phosphate (Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>) et de Zn-Kerolite ou Zn-Hydrotalcite (Panfili *et al.*, 2005).

#### 4.2.4. Ligands du sol

Les calculs thermodynamiques de Zhang *et al.* (2010) montrent que même de très petites nanoparticules de ZnS ne peuvent pas se dissoudre dans un milieu faiblement basique sans un agent complexant. Les ligands présents dans le milieu font partie des facteurs extrinsèques qui peuvent influencer la dissolution des nanoparticules (Wagner *et al.*, 2014). Les composés ayant une affinité forte pour le Zn peuvent se fixer au Zn, ce qui provoque la dissolution des nano-ZnS. Les ligands peuvent aussi inhiber la dissolution en formant un enrobage autour des nanoparticules pouvant provoquer l'agrégation des nanoparticules. Lorsque les particules sont agrégées, il y a moins de surface d'échange disponible donc la dissolution sera plus lente (Wagner *et al.*, 2014).

Différentes études sur la spéciation du Zn dans le sol permettent d'identifier les composants qui ont une affinité pour le Zn. Ces études convergent toutes vers une phase principale de Zn associée aux phyllosilicates (kerolites, (Panfili *et al.*, 2005; Jacquat *et al.*, 2008; Van Damme *et al.*, 2010), kaolinite (Yamamoto *et al.*, 2018), smectites (Jacquat *et al.*, 2009)) et une phase plus ou moins importante de Zn tétraédrique qui peut être lié à la matière organique ou aux oxydes de Fer (Isaure *et al.*, 2005; Jacquat *et al.*, 2009; Van Damme *et al.*, 2010). La nature des phases qui précipitent dans le sol dépend principalement du pH et de la concentration en Zn par rapport aux sites d'adsorptions disponibles (Jacquat *et al.*, 2009). Dans des sols calcaires contaminés en Zn, la concentration en Silicium et Aluminium disponibles contrôle également la nature des phases qui précipitent (Jacquat *et al.*, 2008).

En résumé, les paramètres de structure des nano-ZnS (taille, contrainte, défauts cristallins) ont le potentiel d'influencer la réactivité des ZnS, bien que cela n'ait jamais été démontré.

**Des résultats expérimentaux sont nécessaires pour valider l'influence des paramètres de structure sur la réactivité des ZnS.**

De plus, les facteurs extrinsèques qui contrôlent la dissolution des ZnS, identifiés dans cette partie bibliographique, sont des facteurs potentiellement présents dans un PRO ou un sol.

**Quels paramètres du sol pourraient influencer la réactivité et le devenir des ZnS lors de l'épandage d'un digestat ?**

D'après les études précédemment discutées, la réactivité et le devenir des nano-ZnS peuvent être contrôlés par (i) des caractéristiques intrinsèques des ZnS et/ou (ii) des caractéristiques du milieu dans lequel les ZnS se trouvent. Cependant, des preuves expérimentales sont nécessaires pour mieux comprendre et prédire le devenir du Zn dans le sol.

## **5. Objectifs**

L'objectif de la thèse est d'étudier la structure et la stabilité des sulfures de Zn présents dans les digestats, produits par méthanisation, et leur comportement après épandage. Les mécanismes et les cinétiques d'oxydation des particules de ZnS seront évalués en fonction des paramètres clés que sont leur structure et la composition du sol. Les résultats acquis permettront une meilleure compréhension de la dynamique de cet élément potentiellement toxique en contexte de recyclage agricole de PRO. Trois sous-objectifs, qui correspondent aux 3 chapitres de résultats de la thèse, ont été définis afin de répondre à cette problématique.

### **5.1. Effet de la méthanisation et du compostage sur la spéciation du Zn dans les PRO**

La caractérisation EXAFS au seuil K du Zn de digestats de méthanisation a souvent mis en évidence la présence de ZnS dans les digestats. Cependant, les proportions de Zn sous forme de sulfures varient fortement selon les études. Ainsi, l'influence de la méthanisation sur la spéciation du Zn n'est pas clairement établie et l'objectif de ce chapitre sera de répondre aux questions suivantes:

- Quelle **proportion de Zn** se trouve sous forme de **sulfures** dans les **digestats**?

- Les **sulfures de Zn** sont-ils sous forme de **nanoparticules** ?

De plus, l'influence du type de PRO sur la spéciation du Zn n'est pas connue car la plupart des PRO étudiés sont des boues de STEP. Hormis le compostage, l'effet de certains traitements appliqués au digestat n'a pas été étudié, par exemple la séparation solide/liquide ou le stockage. Enfin, la majorité des études ont été réalisées à partir d'échantillons de laboratoire, nous manquons de résultats sur des PRO prélevés sur des sites de traitement en fonctionnement.

Pour répondre à ces questions, nous avons donc étudié l'influence de la méthanisation et des différents traitements appliqués au digestat sur la spéciation du Zn : séparation solide liquide, stockage et compostage. Cette étude a été conduite sur une série d'échantillons, prélevés sur des sites en fonctionnement, représentatifs de l'ensemble des PRO traités en France : urbains, agricoles, industriels. La spéciation du Zn a été déterminée par EXAFS au seuil K du Zn avec une librairie de références intégrant des sulfures de Zn de différentes tailles afin de mieux caractériser les ZnS dans les digestats.

## 5.2. Influence du milieu PRO sur la réactivité des nano-ZnS formées

Les ZnS qui précipitent dans les PRO se transforment rapidement après leur exposition à l'oxygène. La transformation des ZnS est plus rapide que ce qui est observé pour d'autre ZnS. L'une des hypothèses pour expliquer cette différence est que les ZnS qui se forment dans les PRO ont des caractéristiques de structure particulières qui contrôlent leur réactivité. Parmi les paramètres intrinsèques qui influencent la réactivité, nous avons identifié la taille, la contrainte et les défauts cristallins d'après la littérature sur d'autres composés. De plus, nous avons vu que les molécules organiques, présentes dans un PRO, ont une influence sur les caractéristiques des nano-ZnS, mais les mécanismes ne sont pas bien connus. Ainsi, nous avons fait le choix d'utiliser des molécules organiques simples comme proxy pour représenter la matrice du PRO et répondre aux questions suivantes :

- Quelle est l'influence des **molécules organiques** sur la **taille et la contrainte des nano-ZnS** ?
- Quelle est l'influence des **paramètres de structure** (taille, contrainte) sur la **réactivité des ZnS** ?

Pour répondre à ces questions, cette partie de l'étude est menée en batch avec des molécules organiques simples (par exemples: cystéine, sérine, glutathion). Afin d'isoler l'influence seule des molécules organiques sur la contrainte, l'effet de la taille des nano-ZnS sur la contrainte a également été étudiée. Les techniques utilisées pour caractériser la structure des nano-ZnS sont la diffraction des rayons X et l'analyse de la diffusion totale des RX par PDF et l'EXAFS au seuil K du Zn. La synthèse de nano-ZnS de différentes tailles a permis d'étudier l'influence des paramètres taille et contrainte sur la dissolution des ZnS dans un système simplifié.

### 5.3. Influence des paramètres extrinsèques sur le devenir des nano-ZnS dans le sol

Enfin, l'état de l'art a permis de mettre en évidence que de nombreux facteurs du milieu dans lequel se trouvent les ZnS jouent un rôle sur leur transformation. La deuxième hypothèse pour expliquer la réactivité des nano-ZnS des PRO par rapport aux autres ZnS est que ce sont des facteurs extrinsèques (paramètres du milieu) qui contrôlent leur réactivité. Les digestats contenant les ZnS sont épandus sur les sols agricoles, ainsi la première partie de ce dernier chapitre de résultats a pour but de répondre aux questions suivantes :

- Quelle est la **cinétique de dissolution** des **nano-ZnS** dans un sol ?
- Quelle est l'**influence des caractéristiques du sol** sur la **réactivité** et le **devenir** des nano-ZnS dans le sol ?

Pour cela, nous avons choisi deux sols qui ont des caractéristiques contrastées: un sol riche en argile provenant de l'île de la Réunion et un sol riche en sable provenant du Sénégal. Chaque sol a été incubé pendant 1 mois avec des nano-ZnS synthétisées. Le Zn labile issu de la dissolution des nano-ZnS a été suivi avec un capteur passif : la DGT (Diffusive Gradient in Thin Films). Afin de distinguer le Zn issu des nano-ZnS du Zn présent naturellement dans le sol, les nanoparticules ont été synthétisées à partir de Zn enrichi en  $^{68}\text{Zn}$ , isotope stable du Zn minoritaire (19% du Zn).

Puis, la deuxième partie présente une étude à l'échelle de la parcelle qui a pour but de comprendre la dynamique du Zn lors du recyclage d'un lisier de porc, depuis sa forme lors du stockage du lisier jusqu'à son devenir à long terme dans le sol après épandage. Plus particulièrement :

- Quelle est la **spéciation du Zn** dans le **lisier**, puis dans le **sol amendé** par rapport au sol non amendé ?

Pour cela, les échantillons en provenance d'un site d'expérimentation longue durée du Brésil sont été caractérisés par EXAFS pour déterminer la spéciation du Zn. Le sol argileux a été soumis à des épandages de lisier de porc pendant 11 ans. Le lisier a également été caractérisé par microscopie dans le but d'imager les phases du Zn. Cette approche permet de compléter la méthodologie mise en place dans la partie 1 du chapitre avec des résultats à l'échelle de la parcelle et sur le long terme.

## Références

- Ademe. (2017). *Déchets, chiffres clés*. Collection Faits et chiffres
- Ademe. (2015). Unité de production de biogaz valorisé par cogénération ou injection ayant bénéficié d'un récépissé d'identification par l'Ademe. *Communication de l'ADEME*.
- Ademe,GRDF. (2014). *Évaluation du potentiel de production de biométhane à partir des boues issues des stations d'épuration des eaux usées urbaines* Étude réalisée pour le compte de l'ADEME et de GrDF par GREENBIRDIE et le CRIGEN (GDF SUEZ)
- Al Seadi, T., Drosch, B., Fuchs, W., Rutz, D.,Janssen, R. (2013). Biogas digestate quality and utilization. In A. Wellinger, Murphy, J., Baxter, D. (Ed.), *The Biogas Handbook – Science, Production and Applications*, (pp. 267-301). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Alburquerque, J. A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M.,Bernal, M. P. (2012). Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy*, 40, 181-189.
- Alvarenga, P., Mourinha, C., Farto, M., Santos, T., Palma, P., Sengo, J., Morais, M.-C.,Cunha-Queda, C. (2015). Sewage sludge, compost and other representative organic wastes as agricultural soil amendments: Benefits versus limiting factors. *Waste management*, 40, 44-52.
- Bae, W., Abdullah, R., Henderson, D.,Mehra, R. K. (1997). Characteristics of Glutathione-Capped ZnS Nanocrystallites. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 237(1), 16-23.
- Bae, W.,Mehra, R. K. (1998). Cysteine-capped ZnS nanocrystallites: Preparation and characterization. *Journal of Inorganic Biochemistry*, 70(2), 125-135.
- Bai, H.-J., Zhang, Z.-M.,Gong, J. (2006). Biological Synthesis of Semiconductor Zinc Sulfide Nanoparticles by Immobilized Rhodobacter sphaeroides. *Biotechnology Letters*, 28(14), 1135-1139.
- Banfield, J. F.,Zhang, H. (2001). Nanoparticles in the environment. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 44(1), 1-58.
- Belon, E., Boisson, M., Deportes, I., Eglin, T., Feix, I., Bispo, A., Galsomies, L., Leblond, S.,Guellier, C. (2012). An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 439, 87-95.
- Benning, L. G.,Waychunas, G. A. (2008). Nucleation, Growth, and Aggregation of Mineral Phases: Mechanisms and Kinetic Controls. In S. L. Brantley, J. D. Kubicki, & A. F. White (Eds.), *Kinetics of Water-Rock Interaction* (pp. pp. 259-335): Springer.
- Bernal, M. P., Alburquerque, J.,Moral, R. (2009). Composting of animal manures and chemical criteria for compost maturity assessment. A review. *Bioresource technology*, 100(22), 5444-5453.
- Chaudri, A. M., Allain, C. M. G., Barbosa-Jefferson, V. L., Nicholson, F. A., Chambers, B. J.,McGrath, S. P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil*, 221(2), 167-179.
- Crolla, A., Kinsley, C.,Pattey, E. (2013). Land application of digestate *The biogas handbook* (pp. 302-325): Elsevier.
- De Yoreo, J. J.,Vekilov, P. G. (2003). Principles of crystal nucleation and growth. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 54(1), 57-93.

- Deonaraine, A., Lau, B. L. T., Aiken, G. R., Ryan, J. N., Hsu-Kim, H. (2011). Effects of Humic Substances on Precipitation and Aggregation of Zinc Sulfide Nanoparticles. *Environmental science & technology*, 45(8), 3217-3223.
- Devi, L. M., Negi, D. P. S. (2013). Effect of starting pH and stabilizer/metal ion ratio on the photocatalytic activity of ZnS nanoparticles. *Materials Chemistry and Physics*, 141(2-3), 797-803.
- Donner, E., Brunetti, G., Zarcinas, B., Harris, P., Tavakkoli, E., Naidu, R., Lombi, E. (2013). Effects of Chemical Amendments on the Lability and Speciation of Metals in Anaerobically Digested Biosolids. *Environmental science & technology*, 47(19), 11157-11165.
- Donner, E., Howard, D. L., Jonge, M. D. d., Paterson, D., Cheah, M. H., Naidu, R., Lombi, E. (2011). X-ray Absorption and Micro X-ray Fluorescence Spectroscopy Investigation of Copper and Zinc Speciation in Biosolids. *Environmental science & technology*, 45(17), 7249-7257.
- Echigo, T., Aruguete, D. M., Murayama, M., Hochella Jr, M. F. (2012). Influence of size, morphology, surface structure, and aggregation state on reductive dissolution of hematite nanoparticles with ascorbic acid. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 90, 149-162.
- Eskelsen, J. R., Xu, J., Chiu, M., Moon, J.-W., Wilkins, B., Graham, D. E., Gu, B., Pierce, E. M. (2018). Influence of structural defects on biomineralized ZnS nanoparticle dissolution: an in-situ electron microscopy study. *Environmental science & technology*, 52(3), 1139-1149.
- Fermoso, F. G., van Hullebusch, E. D., Guibaud, G., Collins, G., Svensson, B. H., Carliell-Marquet, C., Vink, J. P. M., Esposito, G., Frunzo, L. (2015). Fate of Trace Metals in Anaerobic Digestion. In G. M. Guebitz, A. Bauer, G. Bochmann, A. Gronauer, & S. Weiss (Eds.), *Biogas Science and Technology* (Vol. 151, pp. 171-195): Springer International Publishing.
- Fowler, T. A., Crundwell, F. K. (1999). Leaching of Zinc Sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: Bacterial Oxidation of the Sulfur Product Layer Increases the Rate of Zinc Sulfide Dissolution at High Concentrations of Ferrous Ions. *Applied and environmental microbiology*, 65(12), 5285-5292.
- Gelabert, A., Sivry, Y., Gobbi, P., Mansouri-Guilani, N., Menguy, N., Brayner, R., Siron, V., Benedetti, M. F., Ferrari, R. (2016). Testing nanoeffect onto model bacteria: Impact of speciation and genotypes. *Nanotoxicology*, 10(2), 216-225.
- Gibbs, J. W. (1878). On the equilibrium of heterogeneous substances. *Transactions of the Connecticut Academy of Arts and Sciences*, 16, 343-524.
- Gilbert, B., Huang, F., Zhang, H., Waychunas, G. A., Banfield, J. F. (2004). Nanoparticles: Strained and Stiff. *Science*, 305(5684), 651-654.
- Giller, K. E., Witter, E., Mcgrath, S. P. (1998). Toxicity of heavy metals to microorganisms and microbial processes in agricultural soils: a review. *Soil biology and biochemistry*, 30(10-11), 1389-1414.
- Gondikas, A. P., Jang, E. K., Hsu-Kim, H. (2010). Influence of amino acids cysteine and serine on aggregation kinetics of zinc and mercury sulfide colloids. *Journal of Colloid and Interface Science*, 347(2), 167-171.
- Gondikas, A. P., Masion, A., Auffan, M., Lau, B. L. T., Hsu-Kim, H. (2012). Early-stage precipitation kinetics of zinc sulfide nanoclusters forming in the presence of cysteine. *Chemical Geology*, 329, 10-17.
- Hargreaves, J., Adl, M., Warman, P. (2008). A review of the use of composted municipal solid waste in agriculture. *Agriculture, Ecosystems & Environment*, 123(1-3), 1-14.

- Heidel, C., Tichomirowa, M., Breitkopf, C. (2011). Sphalerite oxidation pathways detected by oxygen and sulfur isotope studies. *Applied geochemistry*, 26(12), 2247-2259.
- Hooda, P. S., Zhang, H. (2008). DGT measurements to predict metal bioavailability in soils. In A. E. Hartemink, A. B. McBratney, & R. Naidu (Eds.), *Chemical Bioavailability in Terrestrial Environment* (Vol. 32, pp. 169-185): Elsevier.
- Hoornweg, D., Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management.
- Houot, S., Pons, M.-N., Pradel, M., Tibi, A., Aubry, C., Augusto, L., Barbier, R., Benoît, P., Brugère, H., Caillaud, M.-A., Casellas, M., Chatelet, A., Dabert, P. D., De Mareschal, S., Doussan, I., Estrillard, C., Fuchs, Jacques, Générmont, S., Giamberini, L., Hélias, A., Jardé, E., Le Perchec, S., Lupton, S., Marron, N., Ménasseri, S., Mollier, A., Morel, C., Mougin, C., Nguyen, C., Parnaudeau, V., Patureau, D., Pourcher, A.-M., Rychen, G., Savini, I., Smolders, E., Topp, E., Vieublé, L., Viguié, C. (2014). *Valorisation des matières fertilisantes d'origine résiduaire sur les sols à usage agricole ou forestier, impacts agronomiques, environnementaux, socio-économiques*. Expertise scientifique collective, rapport, INRA-CNRS-Irstea (France) 930p.
- Huang, F., Banfield, J. F. (2005). Size-dependent phase transformation kinetics in nanocrystalline ZnS. *Journal of the American Chemical Society*, 127(12), 4523-4529.
- Huang, F., Gilbert, B., Zhang, H., Banfield, J. F. (2004). Reversible, Surface-Controlled Structure Transformation in Nanoparticles Induced by an Aggregation State. *Physical Review Letters*, 92(15), 155501.
- Isaure, M.-P., Laboudigue, A., Manceau, A., Sarret, G., Tiffreau, C., Trocellier, P., Lambelle, G., Hazemann, J.-L., Chateigner, D. (2002). Quantitative Zn speciation in a contaminated dredged sediment by  $\mu$ -PIXE,  $\mu$ -SXRF, EXAFS spectroscopy and principal component analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 66(9), 1549-1567.
- Isaure, M.-P., Manceau, A., Geoffroy, N., Laboudigue, A., Tamura, N., Marcus, M. A. (2005). Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(5), 1173-1198.
- Jacquat, O., Voegelin, A., Kretzschmar, R. (2009). Soil properties controlling Zn speciation and fractionation in contaminated soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 73(18), 5256-5272.
- Jacquat, O., Voegelin, A., Villard, A., Marcus, M. A., Kretzschmar, R. (2008). Formation of Zn-rich phyllosilicate, Zn-layered double hydroxide and hydrozincite in contaminated calcareous soils. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 72(20), 5037-5054.
- Jensen, J., Larsen, M., Bak, J. (2016). National monitoring study in Denmark finds increased and critical levels of copper and zinc in arable soils fertilized with pig slurry. *Environmental Pollution*, 214, 334-340.
- Jensen, M. B., Møller, J., Scheut, C. (2017). Assessment of a combined dry anaerobic digestion and post-composting treatment facility for source-separated organic household waste, using material and substance flow analysis and life cycle inventory. *Waste management*, 66, 23-35.
- Jiang, Q., Liang, L., Zhao, D. (2001). Lattice contraction and surface stress of fcc nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(27), 6275-6277.
- Jin, Z.-H., Gumbsch, P., Albe, K., Ma, E., Lu, K., Gleiter, H., Hahn, H. (2008). Interactions between non-screw lattice dislocations and coherent twin boundaries in face-centered cubic metals. *Acta Materialia*, 56(5), 1126-1135.

- Kashchiev, D. (2000). *Nucleation, Basic Theory with Applications* (D. Kashchiev Ed.): Butterworth-Heinemann.
- Khalkhali, M., Liu, Q., Zeng, H., Zhang, H. (2015). A size-dependent structural evolution of ZnS nanoparticles. *Scientific reports*, 5, 14267.
- Khalkhali, M., Zeng, H., Liu, Q., Zhang, H. (2016). Structural evolutions of ZnS nanoparticles in hydrated and bare states. *The Journal of Physical Chemistry C*, 120(14), 7870-7884.
- Kho, R., Nguyen, L., Torres-Martínez, C. L., Mehra, R. K. (2000). Zinc-Histidine as Nucleation Centers for Growth of ZnS Nanocrystals. *Biochemical and Biophysical Research Communications*, 272(1), 29-35.
- Kim, B., Levard, C., Murayama, M., Brown, G. E., Hochella, M. F. (2014). Integrated Approaches of X-Ray Absorption Spectroscopic and Electron Microscopic Techniques on Zinc Speciation and Characterization in a Final Sewage Sludge Product. *Journal of Environmental Quality*, 43(3), 908-916.
- Kopittke, P. M., Menzies, N. W., Wang, P., McKenna, B. A., Wehr, J. B., Lombi, E., Kinraide, T. B., Blamey, F. P. C. (2014). The rhizotoxicity of metal cations is related to their strength of binding to hard ligands. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(2), 268-277.
- Labrenz, M., Druschel, G. K., Thomsen-Ebert, T., Gilbert, B., Welch, S. A., Kemner, K. M., Logan, G. A., Summons, R. E., Stasio, G. D., Bond, P. L., Lai, B., Kelly, S. D., Banfield, J. F. (2000). Formation of Sphalerite (ZnS) Deposits in Natural Biofilms of Sulfate-Reducing Bacteria. *Science*, 290(5497), 1744-1747.
- Lau, B. L. T., Hsu-Kim, H. (2008). Precipitation and Growth of Zinc Sulfide Nanoparticles in the Presence of Thiol-Containing Natural Organic Ligands. *Environmental science & technology*, 42(19), 7236-7241.
- Lebuhn, M., Munk, B., Effenberger, M. (2014). Agricultural biogas production in Germany- from practice to microbiology basics. *Energy, Sustainability and Society*, 4(1), 10.
- Leclerc, A., Laurent, A. (2017). Framework for estimating toxic releases from the application of manure on agricultural soil: National release inventories for heavy metals in 2000-2014. *Science of the total environment*, 590, 452-460.
- Legros, S., Chaurand, P., Rose, J. r., Masion, A., Briois, V., Ferrasse, J.-H., Macary, H. S., Bottero, J.-Y., Doelsch, E. (2010a). Investigation of copper speciation in pig slurry by a multitechnique approach. *Environmental science & technology*, 44(18), 6926-6932.
- Legros, S., Doelsch, E., Masion, A., Rose, J., Borshneck, D., Proux, O., Hazemann, J. L., Saint-Macary, H., Bottero, J. Y. (2010b). Combining Size Fractionation, Scanning Electron Microscopy, and X-ray Absorption Spectroscopy to Probe Zinc Speciation in Pig Slurry. *Journal of Environmental Quality*, 39(2), 531-540.
- Legros, S., Levard, C., Marcato-Romain, C. E., Guiresse, M., Doelsch, E. (2017). Anaerobic Digestion Alters Copper and Zinc Speciation. *Environmental science & technology*, 51(18), 10326-10334.
- Li, S., Lian, J., Jiang, Q. (2008). Modeling size and surface effects on ZnS phase selection. *Chemical Physics Letters*, 455(4-6), 202-206.
- Lombi, E., Donner, E., Tavakkoli, E., Turney, T. W., Naidu, R., Miller, B. W., Scheckel, K. G. (2012). Fate of Zinc Oxide Nanoparticles during Anaerobic Digestion of Wastewater and Post-Treatment Processing of Sewage Sludge. *Environmental science & technology*, 46(16), 9089-9096.



- Lors, C., Tiffreau, C., Laboudigue, A. (2004). Effects of bacterial activities on the release of heavy metals from contaminated dredged sediments. *Chemosphere*, 56(6), 619-630.
- Luo, L., Ma, Y., Zhang, S., Wei, D., Zhu, Y.-G. (2009). An inventory of trace element inputs to agricultural soils in China. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2524-2530.
- Luther III, G. W., Theberge, S. M., Rickard, D. T. (1999). Evidence for aqueous clusters as intermediates during zinc sulfide formation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 63(19-20), 3159-3169.
- Ma, R., Levard, C., Judy, J. D., Unrine, J. M., Durenkamp, M., Martin, B., Jefferson, B., Lowry, G. V. (2014). Fate of Zinc Oxide and Silver Nanoparticles in a Pilot Wastewater Treatment Plant and in Processed Biosolids. *Environmental science & technology*, 48(1), 104-112.
- Ma, R., Levard, C., Marinakos, S. M., Cheng, Y., Liu, J., Michel, F. M., Brown, G. E., Lowry, G. V. (2012). Size-Controlled Dissolution of Organic-Coated Silver Nanoparticles. *Environmental science & technology*, 46(2), 752-759.
- Malarkodi, C., Annadurai, G. (2013). A novel biological approach on extracellular synthesis and characterization of semiconductor zinc sulfide nanoparticles. *Applied Nanoscience*, 3(5), 389-395.
- Maree, P., Barbour, J., Van der Veen, J., Kavanagh, K., Bulle-Lieuwma, C., Vieggers, M. (1987). Generation of misfit dislocations in semiconductors. *Journal of applied physics*, 62(11), 4413-4420.
- Masadeh, A., Božin, E., Farrow, C., Paglia, G., Juhas, P., Billinge, S., Karkamkar, A., Kanatzidis, M. (2007). Quantitative size-dependent structure and strain determination of CdSe nanoparticles using atomic pair distribution function analysis. *Physical Review B*, 76(11), 115413.
- Mavrikakis, M., Hammer, B., Nørskov, J. K. (1998). Effect of strain on the reactivity of metal surfaces. *Physical Review Letters*, 81(13), 2819.
- Meldrum, F. C., Cölfen, H. (2008). Controlling mineral morphologies and structures in biological and synthetic systems. *Chemical reviews*, 108(11), 4332-4432.
- Mersmann, A. (1999). Crystallization and precipitation. *Chemical Engineering and Processing: Process Intensification*, 38(4-6), 345-353.
- Michel, F. M., Barrón, V., Torrent, J., Morales, M. P., Serna, C. J., Boily, J.-F., Liu, Q., Ambrosini, A., Cismasu, A. C., Brown, G. E. (2010). Ordered ferrimagnetic form of ferrihydrite reveals links among structure, composition, and magnetism. *Proceedings of the National Academy of Sciences*, 107(7), 2787-2792.
- Moletta, R. (2008). Méthanisation de la biomasse. *Techniques de l'ingénieur Bioprocédés dans les domaines de l'énergie et de l'environnement*.
- Möller, K., Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242-257.
- Moreau, J. W., Webb, R. I., Banfield, J. F. (2004). Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. *American Mineralogist*, 89(7), 950-960.
- Moreau, J. W., Weber, P. K., Martin, M. C., Gilbert, B., Hutcheon, I. D., Banfield, J. F. (2007). Extracellular Proteins Limit the Dispersal of Biogenic Nanoparticles. *Science*, 316(5831), 1600-1603.
- Mudunkotuwa, I. A., Grassian, V. H. (2011). The devil is in the details (or the surface): impact of surface structure and surface energetics on understanding the behavior

- of nanomaterials in the environment. *Journal of Environmental Monitoring*, 13(5), 1135-1144.
- Nagoshi, M., Kawano, T., Fujiwara, S., Miura, T., Udagawa, S., Nakahara, K., Takaoka, M., Uruga, T. (2005). Chemical states of trace heavy metals in sewage sludge by XAFS spectroscopy. *Physica Scripta*, 2005(T115), 946.
- Naidu, R., Semple, K. T., Megharaj, M., Juhasz, A., Bolan, N., Gupta, S., Clothier, B., Schulin, R. (2008). Bioavailability: Definition, assessment and implications for risk assessment. *Developments in soil science*, 32, 39-51.
- Nicholson, F., Smith, S., Alloway, B., Carlton-Smith, C., Chambers, B. (2003). An inventory of heavy metals inputs to agricultural soils in England and Wales. *Science of the total environment*, 311(1), 205-219.
- Nkoa, R. (2014). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 473-492.
- Nolan, A. L., Lombi, E., McLaughlin, M. J. (2003). Metal bioaccumulation and toxicity in soils—why bother with speciation? *Australian Journal of Chemistry*, 56(3), 77-91.
- Nützenadel, C., Züttel, A., Chartouni, D., Schmid, G., Schlapbach, L. (2000). Critical size and surface effect of the hydrogen interaction of palladium clusters. *The European Physical Journal D*, 8(2), 245-250.
- Panfili, F., Manceau, A., Sarret, G., Spadini, L., Kirpichtchikova, T., Bert, V., Laboudigue, A., Marcus, M. A., Ahamdach, N., Libert, M.-F. (2005). The effect of phytostabilization on Zn speciation in a dredged contaminated sediment using scanning electron microscopy, X-ray fluorescence, EXAFS spectroscopy, and principal components analysis. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(9), 2265-2284.
- Park, T. J., Lee, K. G., Lee, S. Y. (2015). Advances in microbial biosynthesis of metal nanoparticles. *Applied Microbiology and Biotechnology*, 100(2), 521-534.
- Peltier, E., Ilipilla, P., Fowle, D. (2011). Structure and reactivity of zinc sulfide precipitates formed in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Applied geochemistry*, 26(9-10), 1673-1680.
- Pratt, A., Lari, L., Hovorka, O., Shah, A., Woffinden, C., Tear, S. P., Binns, C., Kröger, R. (2014). Enhanced oxidation of nanoparticles through strain-mediated ionic transport. *Nature materials*, 13(1), 26.
- Priadi, C., Le Pape, P., Morin, G., Ayrault, S., Maillot, F., Juillot, F., Hochreutener, R., Llorens, I., Testemale, D., Proux, O., Brown, G. E. (2012). X-ray Absorption Fine Structure Evidence for Amorphous Zinc Sulfide as a Major Zinc Species in Suspended Matter from the Seine River Downstream of Paris, Ile-de-France, France. *Environmental science & technology*, 46(7), 3712-3720.
- Rath, P., Paramguru, R., Jena, P. (1981). Kinetics of dissolution of zinc sulphide in aqueous ferric chloride solution. *Hydrometallurgy*, 6(3-4), 219-225.
- Robson, T. C., Braungardt, C. B., Rieuwerts, J., Worsfold, P. (2014). Cadmium contamination of agricultural soils and crops resulting from sphalerite weathering. *Environmental Pollution*, 184, 283-289.
- Romeo, A., Vacchina, V., Legros, S., Doelsch, E. (2014). Zinc fate in animal husbandry systems. *Metallomics*, 6(11), 1999-2009.
- Smith, S. M., Martell, A. E. (2004). Critically selected stability constants of metal complexes database. *Standard reference database 46, version 8.0, NIST, Gaithersburg*.
- Strasser, P., Koh, S., Anniyev, T., Greeley, J., More, K., Yu, C., Liu, Z., Kaya, S., Nordlund, D., Ogasawara, H. (2010). Lattice-strain control of the activity in dealloyed core-shell fuel cell catalysts. *Nature chemistry*, 2(6), 454.

- Sukola, K., Wang, F., Tessier, A. (2005). Metal-sulfide species in oxic waters. *Analytica chimica acta*, 528(2), 183-195.
- Tella, M., Bravin, M. N., Thuriès, L., Cazevieuille, P., Chevassus-Rosset, C., Collin, B., Chaurand, P., Legros, S., Doelsch, E. (2016). Increased zinc and copper availability in organic waste amended soil potentially involving distinct release mechanisms. *Environmental Pollution*, 212, 299-306.
- Templeton, D. M., Ariese, F., Cornelis, R., Danielsson, L.-G., Muntau, H., van Leeuwen, H. P., Lobinski, R. (2000). Guidelines for terms related to chemical speciation and fractionation of elements. Definitions, structural aspects, and methodological approaches (IUPAC Recommendations 2000). *Pure and applied chemistry*, 72(8), 1453-1470.
- Van Damme, A., Degryse, F., Smolders, E., Sarret, G., Dewit, J., Swennen, R., Manceau, A. (2010). Zinc speciation in mining and smelter contaminated overbank sediments by EXAFS spectroscopy. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 74(13), 3707-3720.
- Van Ginneken, L., Chowdhury, M. J., Blust, R. (1999). Bioavailability of cadmium and zinc to the common carp, *Cyprinus carpio*, in complexing environments: a test for the validity of the free ion activity model. *Environmental toxicology and chemistry*, 18(10), 2295-2304.
- Van Lier, Jules B., Nidal, M., Grietje, a. Z. (2008). Anaerobic Wastewater Treatment. Henze M., van Loosdrecht M., Ekama G and Brdjanovic D. Eds, *Biological Wastewater treatment: Principles, Modelling and design* (Chapt. 16), 401-441.
- Villa-Gomez, D. K., van Hullebusch, E. D., Maestro, R., Farges, F., Nikitenko, S., Kramer, H., Gonzalez-Gil, G., Lens, P. N. L. (2014). Morphology, Mineralogy, and Solid-Liquid Phase Separation Characteristics of Cu and Zn Precipitates Produced with Biogenic Sulfide. *Environmental science & technology*, 48(1), 664-673.
- Voegelin, A., Jacquat, O., Pfister, S., Barmettler, K., Scheinost, A. C., Kretzschmar, R. (2011). Time-Dependent Changes of Zinc Speciation in Four Soils Contaminated with Zincite or Sphalerite. *Environmental science & technology*, 45(1), 255-261.
- Wagner, S., Gondikas, A., Neubauer, E., Hofmann, T., von der Kammer, F. (2014). Spot the difference: engineered and natural nanoparticles in the environment—release, behavior, and fate. *Angewandte Chemie International Edition*, 53(46), 12398-12419.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., Lin, Z. P. (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, 75(11), 1468-1476.
- Warne, M. S. J., Heemsbergen, D., Stevens, D., McLaughlin, M., Cozens, G., Whatmuff, M., Broos, K., Barry, G., Bell, M., Nash, D. (2008). Modeling the toxicity of copper and zinc salts to wheat in 14 soils. *Environmental Toxicology and Chemistry: An International Journal*, 27(4), 786-792.
- Wenger, K., Tandy, S., Nowack, B. (2005). Effects of Chelating Agents on Trace Metal Speciation and Bioavailability. In B. Nowack & J. M. VanBriesen (Eds.), *Biogeochemistry of Chelating Agents* (Vol. 910, pp. 204-224): American Chemical Society.
- Xie, M., Alsina, M. A., Yuen, J., Packman, A. I., Gaillard, J.-F. (2019). Effects of resuspension on the mobility and chemical speciation of zinc in contaminated sediments. *Journal of hazardous materials*, 364, 300-308.
- Xu, J., Murayama, M., Roco, C. M., Veeramani, H., Marc Michel, F., Donald Rimstidt, J., Winkler, C., Hochella Jr, M. F. (2016). Highly-Defective Nanocrystals of ZnS Formed

- via Dissimilatory Bacterial Sulfate Reduction: a Comparative Study with their Abiogenic Analogues. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 180, 1-14.
- Yamamoto, K., Hashimoto, Y., Kang, J., Kobayashi, K. (2018). Speciation of Phosphorus Zinc and Copper in Soil and Water-Dispersible Colloid Affected by a Long-Term Application of Swine Manure Compost. *Environmental science & technology*, 52(22), 13270-13278.
- Zhang, H., Chen, B., Banfield, J. F. (2010). Particle size and pH effects on nanoparticle dissolution. *The Journal of Physical Chemistry C*, 114(35), 14876-14884.
- Zhang, H., Chen, B., Gilbert, B., Banfield, J. F. (2006). Kinetically controlled formation of a novel nanoparticulate ZnS with mixed cubic and hexagonal stacking. *Journal of Materials Chemistry*, 16(3), 249-254.
- Zhang, H., Gilbert, B., Huang, F., Banfield, J. F. (2003). Water-driven structure transformation in nanoparticles at room temperature. *Nature*, 424(6952), 1025-1029.
- Zhang, H., Lombi, E., Smolders, E., McGrath, S. (2004). Kinetics of Zn release in soils and prediction of Zn concentration in plants using diffusive gradients in thin films. *Environmental science & technology*, 38(13), 3608-3613.
- Zirkler, D., Peters, A., Kaupenjohann, M. (2014). Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 67, 89-98.

## **Chapitre 2 - Influence des traitements sur la spéciation du zinc dans les PRO : une étude globale**



## Sommaire

Abstract .....	78
Introduction .....	78
1. Experimental section .....	80
1.1. Preparation of organic waste samples .....	80
1.2. Physical-chemical analyses .....	82
1.3. Preparation of samples and reference compounds for EXAFS analysis .....	82
1.4. EXAFS spectra acquisition and analysis .....	83
2. Results and Discussion .....	84
2.1. Changes in physical-chemical characteristics of OWs during treatment .....	84
2.1.1. Dry Matter, organic carbon and pH .....	86
2.1.2. Zn concentration .....	86
2.2. Change in Zn speciation during treatment .....	87
2.2.1. Zn speciation in raw OWs .....	90
2.2.2. Zn speciation in digestates .....	91
2.2.3. Zn speciation in the liquid and solid fractions of the digestate .....	91
2.2.4. Zn speciation in composts .....	91
2.3. The nano-size of ZnS explains its ephemeral nature .....	92
2.4. Environmental implications .....	94
Associated content.....	95
Author information .....	95
Acknowledgements.....	95
References.....	96
Annexe: Supporting information .....	100
SI-1: Influence of freeze drying process on Zn K-edge EXAFS spectrum .....	100
SI-2: Influence of aging of freeze-dried sample on Zn speciation.....	100
SI-3: Reference compounds for linear combination fitting .....	103
SI-4: Detailed results of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy linear combination fitting.....	105
References .....	112

Les résultats de cette étude ont été publiés en octobre 2018 dans la revue *Environmental Science & Technology*. L'article est donc présenté en anglais, tel que soumis à la revue avant publication. Il est composé d'un résumé de l'étude, un rappel bibliographique du contexte et de la nécessité d'établir des tendances générales sur l'influence des traitements sur la spéciation du zinc (Zn) dans les PRO. Les objectifs décrits dans cet article correspondent aux objectifs présentés pour la thèse dans le chapitre 1, paragraphe 5.1. Puis, comme dans les chapitres suivants, les matériaux et méthodes utilisés sont décrits avant de discuter des résultats. Des renseignements complémentaires cités dans l'article (les numéros de figures et de tableaux précédés d'un S renvoient vers le Supporting Information) sont disponibles à la fin du chapitre en annexe.

Les principaux résultats de cette étude sont les suivants :

- La méthanisation favorise la formation de nano-ZnS quel que soit la composition initiale du PRO. Les nano-ZnS sont donc la forme majoritaire du Zn dans tous les digestats.
- Les PRO bruts ayant une faible teneur en matière sèche (<16%) contiennent également des nano-ZnS
- Le compostage d'un PRO brut ou d'un digestat contenant des nano-ZnS provoque la transformation quasi complète des nano-ZnS
- La forme nanoparticulaire a été mise en évidence dans chaque PRO contenant des ZnS
- L'échantillonnage et la manipulation des échantillons a une importance cruciale pour l'étude de la spéciation du Zn dans le PRO



## **Drastic change in zinc speciation during anaerobic digestion and composting: instability of nano-sized zinc sulfide**

*Maureen Le Bars<sup>†‡\*</sup>, Samuel Legros<sup>§</sup>, Clément Levard<sup>‡</sup>, Perrine Chaurand<sup>‡</sup>, Marie Tella<sup>⊥</sup>,  
Mauro Rovezzi<sup>||</sup>, Patrick Browne<sup>#</sup>, Jérôme Rose<sup>‡</sup>, Emmanuel Doelsch<sup>†</sup>*

<sup>†</sup> CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398 Montpellier, France

Recyclage et Risque, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

<sup>§</sup> CIRAD, UPR Recyclage et risque, 18524 Dakar, Senegal

Recyclage et Risque, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

<sup>‡</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, INRA, Coll France, CEREGE, Aix-en-Provence, France

<sup>⊥</sup> CIRAD, US Analyse, F-34398 Montpellier, France

Analyse, Univ Montpellier, CIRAD, Montpellier, France

<sup>||</sup> Univ Grenoble Alpes, CNRS, IRD, Irstea, Météo France, OSUG, FAME, 38000  
Grenoble, FRANCE

<sup>#</sup> <https://github.com/ptbrowne>

\*Corresponding author. Maureen Le Bars, [maureenlebars@gmail.com](mailto:maureenlebars@gmail.com)

**KEYWORDS.** Digestate, Compost, X-ray absorption spectroscopy (EXAFS), Organic waste, Agricultural recycling, Nanoparticles

## Abstract

Zinc (Zn) is a potentially toxic trace element that is present in large amounts in organic wastes (OWs) spread on agricultural lands as fertilizer. Zn speciation in OW is a crucial parameter to understand its fate in soil after spreading and to assess the risk associated with agricultural recycling of OW. Here, we investigated changes in Zn speciation from raw OWs up to digestates and/or composts for a large series of organic wastes sampled in full-scale plants. Using extended X-ray absorption fine structure (EXAFS), we show that nano-sized Zn sulfide (nano-ZnS) is a major Zn species in raw liquid OWs and a minor species in raw solid OWs. Whatever the characteristics of the raw OW, anaerobic digestion always favors the formation of nano-ZnS (>70% of zinc in digestates). However, after 1 to 3 months of composting of OWs, nano-ZnS becomes a minor species (<10% of zinc). In composts, Zn is mostly present as amorphous Zn phosphate and Zn sorbed to ferrihydrite. These results highlight (i) the influence of OW treatment on Zn speciation and (ii) the chemical instability of nano-ZnS formed in OW in anaerobic conditions.

## Introduction

Organic waste (OW) production is steadily increasing as a result of the growth of the world population (Hoornweg *et al.*, 2013) and there is thus an urgent need for sustainable OW management. OWs have different origins: agricultural (livestock slurries, harvest residues), urban (sewage sludge), industrial (food industry by-products) and municipal waste (OW collected from private households) (Gomez, 2013). Among the solutions for sustainable OW management, anaerobic digestion (AD) is gaining interest because biogas can be produced by biological decomposition of organic matter (Gomez, 2013) and because of the value of the organic residue (called digestate) as fertilizer (Al Seadi *et al.*, 2013). The short term advantages of applying digestate on cropped soils have already been evidenced (Möller et Müller, 2012), but recently, questions have been raised about the long-term impact of the accumulation of trace elements (TEs) in soils after recycling of digestate (Nkoa, 2014). With increasing interest in anaerobic digestion (AD) worldwide, it is crucial to determine the risk associated with agricultural recycling of digestate.

Among all the TEs present in OWs, zinc (Zn) is the most applied on agricultural lands (Belon *et al.*, 2012; Leclerc et Laurent, 2017). In particular, sewage sludge and livestock manures used as amendments have relatively high concentrations of Zn (321-4753 mg/kg) (Pathak *et al.*, 2009; Smith, 2009; Albuquerque *et al.*, 2012; Tampio *et al.*, 2016). As Zn has been shown to be hazardous for plants (Chaudri *et al.*, 2000; Jin *et al.*, 2008; Wang *et al.*, 2009; Alonso-Blázquez *et al.*, 2015), regulations have been introduced to limit

the environmental impact of OW recycling. However, the regulations are based on total Zn (and more generally on TE) concentrations in OW (Collin et Doelsch, 2010; Saveyn *et al.*, 2014), whereas Zn eco-toxicity not only depends on the total concentration but also on Zn speciation, which determines its bioavailability (Nolan *et al.*, 2003). For instance, different toxicity mechanisms have been described when *Escherichia coli* were exposed to nanoparticulate ZnO or dissolved Zn (Gelabert *et al.*, 2016).

Recent studies using X-ray absorption spectroscopy (XAS) have shown that part of Zn is present as zinc sulfide (ZnS) in raw OWs (Formentini *et al.*, 2017; Legros *et al.*, 2017) and digestates (Nagoshi *et al.*, 2005; Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013; Kim *et al.*, 2014; Legros *et al.*, 2017). This technique is thus suitable to determine Zn speciation in a complex matrix such as OW (Legros *et al.*, 2010a; Legros *et al.*, 2010b). Surprisingly, the proportion of ZnS present in OWs is wide, ranging from 0 to 100% in raw OWs (Formentini *et al.*, 2017; Legros *et al.*, 2017) and 0 to 96% in digestates (Nagoshi *et al.*, 2005; Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013; Legros *et al.*, 2017). These differences can be explained by several factors including (i) the type of reactor sampled (lab-scale vs. full-scale reactors), (ii) the origin and the nature of the OW (agricultural vs. urban, solid vs. liquid) and/or (iii) the processing steps that may differ from one laboratory/site to another (e.g. hydraulic retention time, storage conditions). All these parameters can affect the physical-chemical conditions of the systems, which, in turn, control the speciation of Zn present in raw or digested OWs.

Some studies have reported that Zn K-edge extended X-ray absorption fine structure (EXAFS) spectra in OWs are (i) less structured than for a crystalline ZnS, and (ii) are similar to what is observed for 3-4 nm ZnS nanoparticles (referred to hereafter as nano-ZnS) (Kim *et al.*, 2014; Formentini *et al.*, 2017; Legros *et al.*, 2017). The presence of nano-sized and not well-organized ZnS in OW is thus suspected. This result is important when assessing the agro-environmental risks of agricultural recycling of OWs. Indeed, although nano-ZnS eco-toxicity has been poorly studied, nanoparticles are generally known for their increased reactivity and associated toxic effects in comparison with their bulk analogs (Auffan *et al.*, 2009).

As the increased reactivity of nanoparticles favors their dissolution and transformation (Auffan *et al.*, 2009), the chemical stability of nano-ZnS during treatment needs to be assessed. Recently, it was shown that ZnS present in sewage sludge digestates was partly or totally oxidized during composting (Nagoshi *et al.*, 2005; Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013) suggesting low stability of ZnS formed during AD. Moreover, no available information is available on Zn speciation in the intermediate products (solid/liquid fractions of digestates) even though these may also be spread on soils.

We conducted a systematic study to investigate the speciation of Zn in raw OWs and treated OWs in a wide range of full-scale OW treatment plants chosen to represent the most common origins of OW (agricultural, urban, industrial OW) and treatment

processes (AD, composting). Special care was taken to sample OWs throughout the process to assess changes in Zn speciation during treatment. Nine full-scale treatment plants that process agricultural, urban and industrial OW were sampled and X-ray absorption spectroscopy was used to investigate the speciation of Zn in raw and treated OWs.

## **1. Experimental section**

### **1.1. Preparation of organic waste samples**

Organic wastes were sampled in nine different full-scale treatment plants distributed throughout France. The plants were chosen to represent the most common types of raw OW used as feedstock for anaerobic digestion (AD) and composting: agricultural waste (livestock effluents, crop residues, etc.), urban wastes (sewage sludge, catering and major-food retailer wastes) and industrial wastes (from the food industry). For the sake of clarity, the treatment plants are separated into three groups based on the origin of the raw OW used as feedstock: Urban (sewage sludge), Agri (agricultural waste), Central (mix of different types of OW digested in a centralized plant). Depending on the plant, OWs are treated by AD and/or composting. Some of the AD plants apply a post-treatment to the digestate: solid/liquid separation, pellet making and/or composting. For example, the Urban 2 plant includes a pelletizing unit (drying, liming and pressing into pellets) to process the solid digestate. For AD, three types of reactors are used depending on the dry matter (DM) content: wet reactors (DM < 16%), semi-dry reactors (DM=[16-22%]) and dry reactors (DM=[22-40%]) (Khalid *et al.*, 2011). All digested OW were processed in wet reactors except Agri 2 (digestate DM content 19%). Another specificity of this plant the temperature (45°C) used is higher than the mesophilic temperature (32-42°C) used in all the other digesters. The characteristics of the OW treatment plants are listed in Table 1.

Table 1 : Description of the treatment plants

Site	Composition of raw organic wastes	Anaerobic digestion			Composting	
		Reactor Size (m <sup>3</sup> )	Duration (days)	Solid/liquid separation characteristics	Duration (weeks)	Co-substrate
Urban-1	Sewage sludge	6200	29	Filter press – 19m <sup>3</sup> /h	4	Green waste
Urban-2	Sewage sludge	6000	34	Centrifugation – 20 m <sup>3</sup> /h	12	Green waste
Urban-3	Activated and centrifuged sewage sludge	-	-	-	6	Green waste
Agri-1	Pig slurry + co-substrates <sup>1</sup>	950	38	Centrifugation – 8 m <sup>3</sup> /h Solid digestate stockpiled	12	None
Agri-2	Solid cow manure + co-substrates <sup>2</sup>	740	42	-	-	-
Agri-3	Solid cow manure	-	-	-	n/a	None
Central-1	Livestock effluents <sup>3</sup> + sewage sludge + food industry waste + harvest residues	1600	70	Scw press – n/a Solid digestate stockpiled	-	-
Central-2	Pig slurries + food industry waste + harvest residues + poultry manure	6000	30	Centrifugation – 8 m <sup>3</sup> /h	-	-
Central-3	Catering and waste from major food retailers + cow slurries + food industry waste + wine making waste	8000	90	-	-	-
<sup>1</sup> harvest residues, grass clippings <sup>2</sup> harvest residues, fecal matter from cattle intestines, grass clippings, poultry litter <sup>3</sup> solid cow, sheep and horse manure - cow and pig slurries						

At each full-scale plant, around 3 kg of dry matter of OWs were sampled at different steps of the treatment. At the seven AD plants (Urban 1-2, Agri 1-2 and Central 1-2-3), OW was sampled just before AD (samples called “raw OW”) and just after AD (samples called “digestate”). When a digestate post-treatment was included in the process, the intermediate products and the final products (ready to apply as fertilizer) were sampled (solid/liquid fractions of digestate called “solid digestate” and “liquid digestate” respectively, pellets and compost). At the two composting plants (Agri-3, Urban-3), raw OW was sampled before composting, and compost was sampled. All the samples were frozen at -20 °C, at the latest three days after on-site sampling.

## **1.2. Physical-chemical analyses**

Dry matter (DM) content of the OW samples was determined at 60 °C by weight (+/- 0.2%). pH was measured directly in liquid OW samples. The pH of solid OW samples was measured after water extraction (ratio of OW to water volume 1:5) according to the ISO 10390 standard. Each pH value is given with an uncertainty of +/- 0.1. Oxidation-reduction potential (ORP) was measured in liquid samples only using a platinum wire electrode (Hamilton Polilyte Plus ORP Arc 120) with +/- 20 mV uncertainty. OW samples were freeze-dried, ground and homogenized for digestion using a mixture of HF, HNO<sub>3</sub> and HClO<sub>4</sub> (ISO 14869-1). Next, concentrations of trace elements were determined using an inductively coupled plasma mass spectrometer (ICP-MS iCAP™ Q Thermo Scientific). Before each element was analyzed, the method of quantification was checked using certified reference material (sewage sludge (BSR 146R) and soil (LAOM CRM 7004)). Measurement uncertainty was less than 15%. Total carbon (ISO 10694) was determined by dry combustion (Dumas) with an elemental NC 2100 Soil Analyzer (Thermo Electron Corp.) The method of analysis was validated using certified reference material (Orchard Leaves Standard 502-055). Uncertainty was less than 5%. Inorganic carbon (ISO 10693) was determined (uncertainty +/-2%) with a Bernard Calcimeter by adding HCl and measuring released CO<sub>2</sub>. Organic carbon (Corg) was deduced from the difference between total and inorganic carbon. Uncertainty of Corg concentration (+/- 7%) was determined by adding absolute uncertainties of total C and inorganic C. One replicate was performed for each OW and each parameter.

## **1.3. Preparation of samples and reference compounds for EXAFS analysis**

When fresh and freeze-dried OW samples were compared using Zn K-edge EXAFS spectra, no influence of the freeze-drying process was observed (Figure S1). Therefore, all OW samples were freeze-dried before EXAFS analysis. Potential changes in Zn speciation during the aging of freeze-dried samples were also assessed. No change in Zn speciation was observed after three weeks of aging at room temperature (Figure S2). However, after six months and one year of aging of the freeze-dried sample, Zn speciation in OW was altered. To avoid these changes, all freeze-dried samples were stored at -20 °C

until EXAFS analysis. Indeed, at -20 °C, there was no change in Zn speciation after 6 months of aging (Figure S3). Freeze-dried OW samples were cryo-ground before analysis (Retsch MM400).

Nano-ZnS reference compound was synthesized by mixing sodium sulfide (Na<sub>2</sub>S) and zinc chloride (ZnCl<sub>2</sub>) solutions at a molar ratio S/Zn of 1 to obtain a final ZnS concentration of 4 g/L. After eight days of agitation, the suspension was dialyzed (MWCO 1kDa) using ultrapure water for two days to remove excess Na<sup>+</sup> and Cl<sup>-</sup> ions. The final nano-ZnS suspension was freeze-dried and the resulting solid was analyzed by X-ray diffraction (X'Pert Pro MPD, Panalytical). A crystallite size of 3 +/- 0.4 nm was determined using the Scherrer equation (Birks et Friedman, 1946) (Figure S4). A commercial ZnS with a crystallite size of 20 nm (Figure S4) was purchased from Sigma Aldrich. Amorphous zinc phosphate (Am-Zn-phosphate) was synthesized following the protocol of Bach *et al.* (2015). Briefly, NaHPO<sub>4</sub> (0.010 M, pH adjusted to 11.9) and ZnCl<sub>2</sub> (0.015 M) solutions were mixed and immediately centrifuged at 12,544 g for 5 min and rinsed three times with acetone (> 99%, VWR). The resulting solid was dried under vacuum. The X-ray diffraction (Figure S5) pattern is in accordance with the result obtained by Bach *et al.* (2015). Reference compounds were diluted in polyvinylpyrrolidone powder, ground and pressed into pellets for EXAFS analysis.

#### 1.4. EXAFS spectra acquisition and analysis

Zn K-edge X-ray absorption spectra were recorded at the SSRL (Stanford, USA) on the 11-2 beamline and at the ESRF (Grenoble, France) on the BM30B (FAME) beamline. Each spectrum was measured at liquid helium temperature to prevent the beam damaging the samples. On both beamlines, the spectra of the OW samples were measured in fluorescence mode with a 30-element solid state Ge detector. The spectra of the reference samples were measured in transmission mode. One spectrum is the average of two to nine scans, depending on the concentration of Zn and the noise level. Each scan was measured on a different spot on the pellet to limit beam damage. Energy calibration was performed using metallic Zn reference foil (absorption edge defined at 9659 eV). Normalization and data reduction were performed according to standard methods (Doelsch *et al.*, 2006) using Athena software (Ravel et Newville, 2005).

A library of Zn reference compound spectra was used to identify Zn species in the OW. Least square linear combination fitting (LCF) was performed for each OW spectrum over a k-range of 2.5 - 10.6 Å<sup>-1</sup> using Athena software (Ravel et Newville, 2005). The library of Zn reference compounds consisted in nano-ZnS, Am-Zn-phosphate, commercial ZnS (see previous section) and reference compounds described elsewhere (Rose *et al.*, 2001; Pokrovsky *et al.*, 2005; Hammer *et al.*, 2006; Sammut *et al.*, 2008; Tella *et al.*, 2016; Legros *et al.*, 2017) (Zn-cysteine, Zn-histidine, Zn-malate, Zn-sorbed to ferrihydrite (Zn-FeOx), Zn-methionine, Zn-cryptomelane Zn-phosphate, Zn-phytate, Zn-Goethite, Zn-oxalate-hydrate, Sphalerite, Smithsonite, Zincite, Zn hydroxide (Figure S6)). Residual factor of LCF was calculated as follows:  $R = \Sigma(k^3\chi(k)_{exp} - k^3\chi(k)_{fit})^2 / \Sigma(k^3\chi(k)_{exp})^2$ . At each

step of the fitting, an additional reference spectrum was added if the two following conditions were true: the R factor decreased by 20% or more and the additional reference had a contribution equal to or higher than 10% among Zn-species. The uncertainty of this LCF method was estimated at +/- 15% (Døelsch *et al.*, 2006).

## **2. Results and Discussion**

### **2.1. Changes in physical-chemical characteristics of OWs during treatment**

The physical-chemical characteristics of OWs during treatment were identified as these parameters can control the speciation of Zn.



*Table 2 : Characteristics of raw and treated OWs (DM= dry matter, ORP=oxidation reduction potential, Corg=organic carbon). The concentrations of all the elements are expressed on a dry matter (DM) basis. Values are given +/- 15% for [Zn], [P] and [Fe], +/- 7% for [Corg], +/- 20 mV for ORP, +/- 0.1 for pH and +/- 0.2% for DM)*

Treatment plant	Sample	DM %	pH	[Zn] mg/kg	[Fe] g/ kg	[P] g/ kg	[Corg] %	ORP (mV)
Urban-1	Raw OW	3.4	6.3	701	49.28	33.80	40	-213
	Digestate	3.1	7.3	822	56.73	39.21	34	-248
	Solid digestate	18.7	6.6	807	87.80	38.92	32	
	Solid digestate + green waste	41.4	6.9	275	25.56	11.00	43	
	Compost	58.2	7.0	423	37.77	17.54	30	
Urban-2	Raw OW	5.3	5.2	475	30.63	20.74	50	-138
	Digestate	2.7	7.6	694	48.61	43.01	37	-249
	Solid digestate	16.4	6.8	696	52.20	40.01	37	
	Pellets	91.7	12.2	543	41.48	33.43	29	
	Compost	96.6	7.75	711	62.04	31.58	27	
Urban-3	Raw OW	17.8	5.9	566	5.23	27.39	49	
	Compost	65.1	7.0	452	10.64	21.42	26	
Agri-1	Raw OW	5.1	6.4	398	2.11	13.72	48	-187
	Digestate	2.5	7.9	723	3.13	16.27	35	-233
	Liquid digestate	2.9	8.1	1 241	4.40	17.48	36	-262
	Solid digestate	36.8	6.8	547	5.34	34.51	34	
	Compost	59.7	6.8	697	8.96	42.27	22	
Agri-2	Raw OW	37.3	8.8	70	0.42	5.27	46	
	Digestate	19.0	9.1	244	3.74	12.32	38	
Agri-3	Raw OW	23.0	9.2	83	1.27	4.79	43	
	Compost	38.9	9.3	116	1.65	5.14	42	

Treatment plant	Sample	DM %	pH	[Zn] mg/kg	[Fe] g/ kg	[P] g/ kg	[Corg] %	ORP (mV)
Central-1	Raw OW	8.0	5.7	325	18.13	13.13	42	-177
	Digestate	11.0	7.9	701	40.61	21.22	32	-241
	Liquid digestate	5.8	7.8	663	38.02	19.71	31	-255
	Solid digestate	26.5	7.6	178	14.19	8.60	47	
Central-2	Raw OW	14.7	6.3	533	18.10	16.45	57	-209
	Digestate	7.4	8.5	841	27.89	32.07	40	-347
	Solid digestate	23.5	6.2	995	32.96	27.43	41	
Central-3	Raw OW	28.0	4.7	64	2.79	5.62	37	-112
	Digestate	7.4	7.9	201	9.05	14.36	34	-341

### 2.1.1. Dry Matter, organic carbon and pH

The range of dry matter (DM) content in the raw OWs used in this study was wide (ranging from 3 to 37%, Table 2), reflecting the diversity of raw OWs used in the full-scale treatment plants. Corg and DM content in the digestate were lower than in raw OW, due to the organic matter released as biogas during AD: 9 to 30% of initial Corg in the raw OW is converted into CH<sub>4</sub> and CO<sub>2</sub> (main gas phases of biogas) (Gomez, 2013), which is in agreement with previous results (Legros *et al.*, 2017). Urban-1 and Central-1 are exceptions to this trend, possibly be explained by the heterogeneity of OW samples over time (Zirkler *et al.*, 2014). Similarly, Corg content decreased during composting: 3 to 47% of initial Corg (in raw OW for Urban-3, Agri-3, solid digestate for Urban-1, Agri-1 or pellets for Urban-2) was converted into CO<sub>2</sub> by carbon mineralization. Despite this C loss, DM content increased after composting due to greater water loss during the aerobic process. pH values ranged from 4.7 to 9.2 in raw OWs and increased after AD due to the degradation of volatile fatty acids, as observed in many studies (Tambone *et al.*, 2009; Albuquerque *et al.*, 2012; Tampio *et al.*, 2016; Knoop *et al.*, 2017a; Knoop *et al.*, 2017b).

### 2.1.2. Zn concentration

The concentration of Zn (Table 2) in raw OWs ranged from 64 to 701 mg/kg. This wide range can be explained by the different origins of the raw OW. Sewage sludges (raw OW in Urban-1, -2, -3) tended to have high concentrations of Zn (475 – 701 mg/kg) as described earlier (Pathak *et al.*, 2009; Smith, 2009; Tampio *et al.*, 2016). In agricultural wastes (Agri-1, -2, -3), we observed high variability of Zn concentrations among treatment plants. The Zn concentration in raw OW sampled from Agri-1 was relatively

high (398 mg/kg) whereas it was lower in samples from Agri-2 and Agri-3 (70 and 83 mg/kg, respectively). Raw OW from Agri-1 contained 80% of pig slurry whereas raw OWs from Agri-2 and Agri-3 contained solid cow manure. The Zn concentration in pig slurries is always significantly higher than in cattle slurries (Nicholson *et al.*, 1999; Albuquerque *et al.*, 2012) because of the addition of Zn in pig feed and low intake by the animal (Romeo *et al.*, 2014). In samples from the centralized AD plants (Central-1, -2, -3), we also observed a wide range of Zn concentrations among sites. Raw OWs with high Zn concentration were those that partly comprised pig slurries (Central-1: 325 mg/kg) and/or sewage sludge (Central-2: 533 mg/kg) in contrast to Central-3 (64 mg/kg) that contained neither. These results show that the concentration of Zn in raw OWs is driven by the origin of the OW.

Similar changes in Zn concentrations during OW treatments (AD or composting) were observed whatever the plant considered. Zn is conserved during AD while organic matter is lost. Therefore Zn concentration in digestates was higher than in raw OW, confirming previous observations (Tampio *et al.*, 2016; Knoop *et al.*, 2017b; Legros *et al.*, 2017). Likewise, Zn concentrations increased following composting as reported by Knoop *et al.* (2017b). The only exception was Urban-3 compost where the decrease in Zn concentration could be due to dilution caused by the addition of green waste.

## 2.2. Change in Zn speciation during treatment

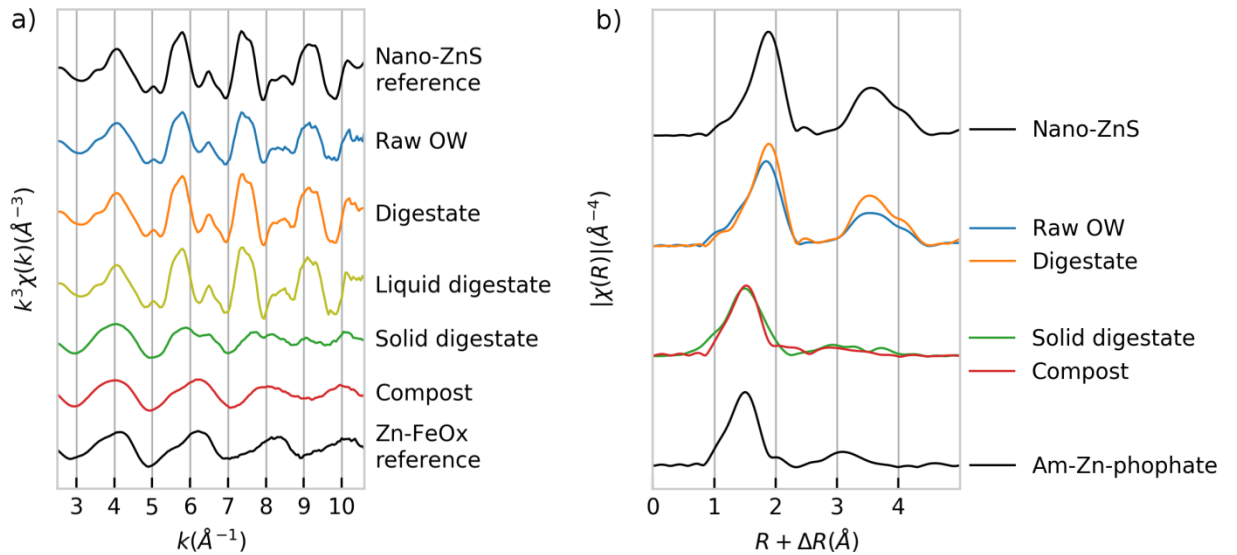


Figure 1: (a) Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy (EXAFS) spectra and (b) respective Fourier transforms (FT) of raw and treated OWs at different steps of the treatment at the Agri-1 site. Nano-ZnS and Zn-FeOx reference compounds have been added for EXAFS comparison.

First, a visual comparison of EXAFS spectra and the corresponding Fourier transforms (FT) of the samples at different steps of the treatment already provides qualitative insight into the change in Zn speciation during the process. Zn K-edge EXAFS spectra (Figure 1 (a)) are characteristic of Zn atomic environment (number of neighboring atoms, their

distance from absorbing Zn atom, static disorder). Fourier transform of EXAFS spectra (Figure 1 (b)) gives an atomic radial distribution function for which the peak position is specific to an interatomic distance (from a Zn atom) and peak intensity depends on the number of neighboring atoms and static disorder. As an example, Figure shows spectra and the corresponding FT obtained at the Agri-1 plant. Data for the eight other plants are presented in supplementary information SI-4.

EXAFS spectra of raw OW and digestate from Agri-1 strongly resembled the spectrum of the nano-ZnS reference compound (Figure 1 (a)). Centrifugation of Agri-1 digestate resulted in two fractions with contrasted Zn speciation. The EXAFS spectrum of the liquid digestate was very similar to the spectrum of the nano-ZnS reference compound whereas the solid fraction of the digestate tended to be closer to the spectrum of the Zn-FeOx reference compound. The FT can be used to distinguish the shift from a Zn—S contribution for raw OW, digestate and liquid digestate to a Zn—O contribution for solid digestate and compost. In addition to this visual inspection of the spectra, linear combination fitting (LCF) was performed to obtain quantitative results on Zn speciation in OWs in all the samples. The modeled spectra of all the samples were compared to experimental spectra (Figure S7). The quantitative LCF results (expressed as a percentage of each Zn species) obtained for samples from the nine treatment plants are shown in Figure 2. Experimental data were modeled with 1 to 4 references and total contributions ranging from 91 to 107%. The contributions of Zn species were normalized to 100% for easier comparison. R-factor of the LCFs ranged from 0.0057 to 0.0292. For the sake of clarity, reference compounds for Zn bound to organic matter (Zn-malate, Zn-histidine or Zn-methionine, see Table S1 and Figure S6) are represented as “Zn-OM”. Also, in some cases, when the contributions of amorphous Zn phosphate (Am-Zn-Phosphate) and Zn bound to ferrihydrite (Zn-FeOx) were less than 25%, it was impossible to differentiate between them (Figure S8). In this particular case, they are represented as “Am-Zn-phosphate or Zn-FeOx”.

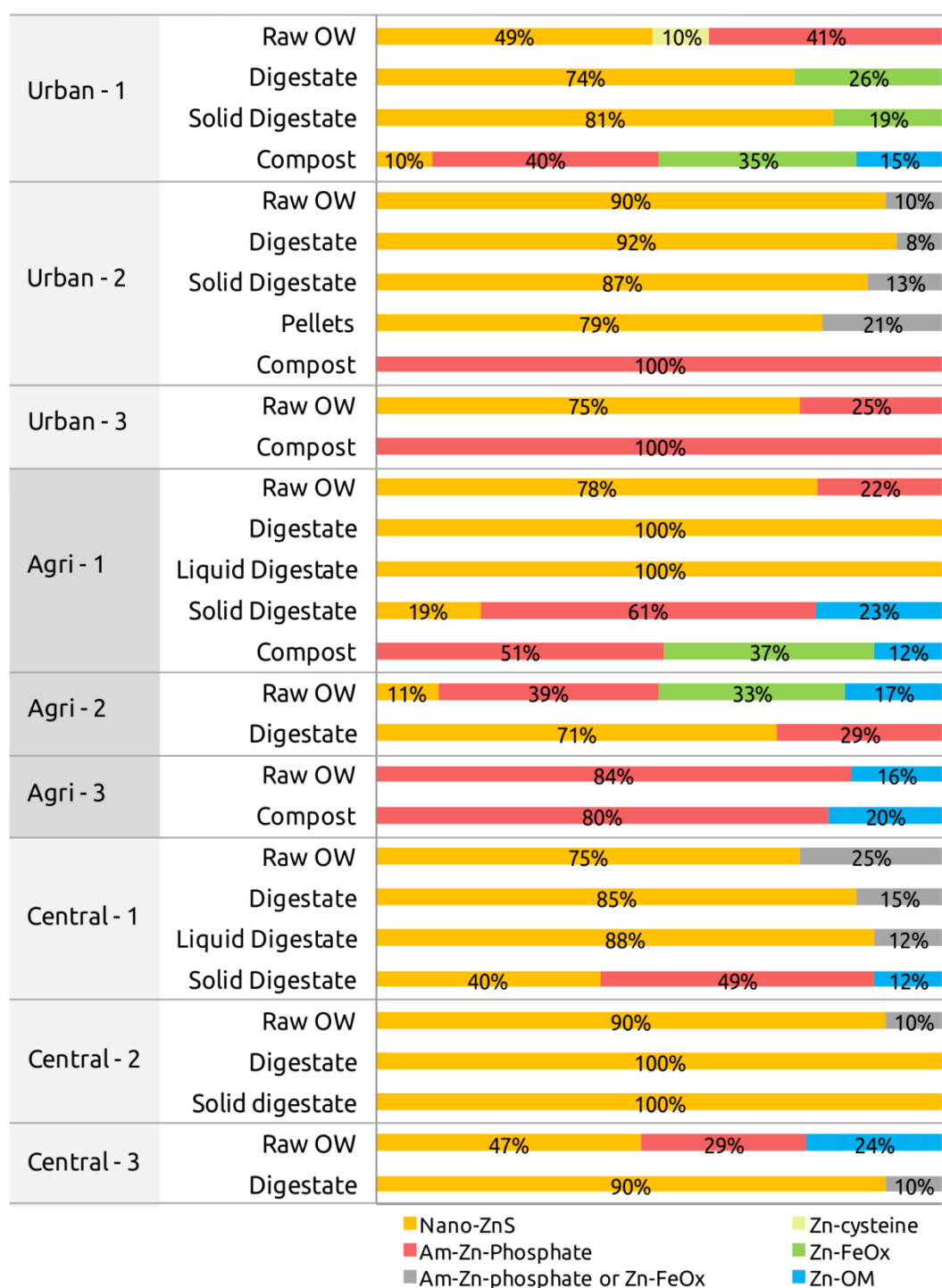


Figure 2: Zn speciation determined from the linear combination fitting of the Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy data for all raw and treated OWs.

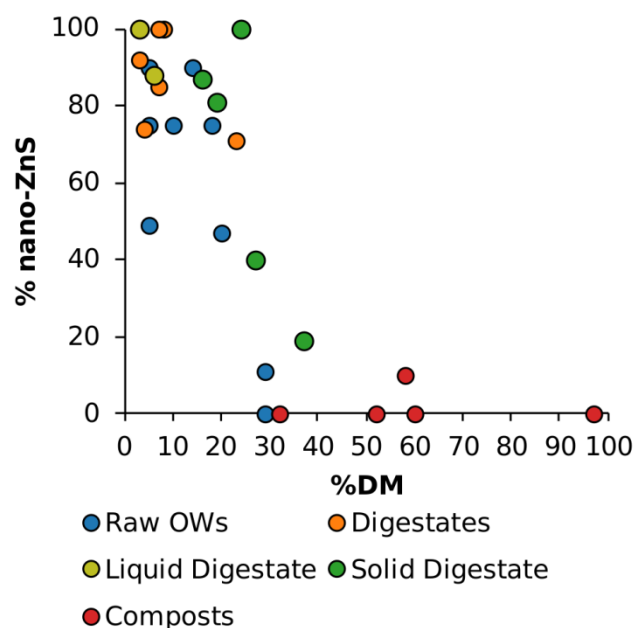


Figure 3: Percentage of nano-ZnS determined by linear combination fitting of the Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy data as a function of dry matter (DM) content for all raw and treated OWs (except for the pellets from Urban-2 as the treatment consisting of drying, liming and pressing is specific).

### 2.2.1. Zn speciation in raw OWs

Nano-ZnS was found to be the main Zn species in raw OWs (ranging from 47 to 90%) except in samples from Agri-2 (11%) and Agri-3 (no detection). The relatively wide range of nano-ZnS may be due to the nature of OW and more importantly to their different physical-chemical storage conditions (DM content and ORP). Indeed, Figure 3 reveals an opposite trend between the percentage of nano-ZnS in raw OW and their DM content. Interestingly, samples from Agri-2 and Agri-3, which did not contain significant amounts of nano-ZnS, had the highest DM content of all the raw OW samples (37 and 23% DM, respectively) (Figure 3). We were unable to measure an ORP value for these samples. However, it is probable that storage at such high DM content favors aerobic conditions. Conversely, reducing conditions in raw liquid OWs from Urban-1,2,3, Agri-1, and Central-1,2 were favored, as shown by ORP values (-213 to -138 mV). This could enhance sulfur reduction and hence the formation of nano-ZnS with the presence of sulfate reducing bacteria (SRB) (Moreau *et al.*, 2004; Peltier *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). The second main Zn species in raw OWs was amorphous Zinc phosphate (Am-Zn-phosphate) which accounted for 22 to 84% of Zn species. This is in agreement with the high affinity of Zn for phosphate compounds (Brehler B. et Wedepohl, 1978). Hopeite (crystalline zinc-phosphate) has already been evidenced in previous studies as a major Zn phase in OW (Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Legros *et al.*, 2017).

### **2.2.2. Zn speciation in digestates**

Whatever the raw OW, nano-ZnS was the dominant Zn species in the digestates. The contribution of nano-ZnS ranged from 71 to 100% in the digestates (Figure 2). What is more, the proportion of nano-ZnS always increased after AD (except in samples from Urban-2) (Figure 2). The more reducing conditions in the digestate compared with in raw OWs, as illustrated by ORP values (from -213 to -112mV in raw OWs and from -347 to -233 mV in digestates, see Table 2), may favor the formation of zinc sulfide. Indeed, AD conditions favor the presence of sulfate reducing bacteria (SRB), which convert sulfate to sulfide (Chen *et al.*, 2008).

### **2.2.3. Zn speciation in the liquid and solid fractions of the digestate**

Zn speciation in the liquid and solid fractions of digestate was influenced by the storage conditions. The speciation of Zn in the solid fractions of digestate from Agri-1 and Central-1 had low percentages of nano-ZnS and differed from that of the digestates, whereas nano-ZnS were still present in samples from Urban-1, Urban-2 and Central-2. Such differences can be explained by the different sampling conditions. Agri-1 and Central-1 solid digestates were sampled in the storage pile whereas the other solid fractions of digestates were sampled directly at the end of the separation process. When sampled in the storage pile, OWs had been exposed to the atmosphere for some days so nano-ZnS may have been oxidized. Nano-ZnS was detected in the liquid fraction after phase separation (Agri-1 and Central-1), which can be explained by the low DM content of the liquid digestates (3 and 6%, respectively). In addition, the storage of liquid digestate without mixing maintains anaerobic conditions, as shown by the ORP values (-262 and -255mV, respectively). Nano-ZnS speciation was preserved after Urban-2 solid digestate was pelleted, probably because the pellets were sampled immediately after processing and exposure to the atmosphere was thus limited. These results highlight the reactivity of ZnS formed in OW and the influence of OW storage and sampling conditions on Zn speciation.

### **2.2.4. Zn speciation in composts**

In compost, Zn speciation differed dramatically from Zn speciation in digestates (Figure 2). Nano-ZnS was no longer observed in any of the composts, (except in Urban-1 compost in which 10% of Zn remained in the form of sulfide). This means that nano-ZnS initially present in raw OW and formed during AD disappeared after four to 12 weeks of composting (Table 1). Previous studies on sewage sludge composted at laboratory scale (Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013) and sewage sludge composted at full scale (Donner *et al.*, 2011) still revealed ZnS or Zn-cysteine (amino acid containing thiol side chain) as a minor part of Zn speciation in compost (26 - 30% for ZnS and 6 -21%, for Zn-cysteine). The main species of Zn in all the composts studied was Am-Zn-phosphate (from 40 to 100%). The second main species was Zn-FeOx present in composts from Urban-1

and Agri-1. Zn associated with organic matter (OM) was present in three composts (Urban-, Agri-1 and Agri-3) as a minor species (12 to 20% of Zn). Other studies on Zn speciation in compost of sewage sludges have shown that the main Zn phase is Zn-FeOx (35-71%), followed by hopeite (crystalline Zn-phosphate, 14-31%) (Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Donner *et al.*, 2013). There are therefore significant differences in results obtained in previous work and the present study. These discrepancies can be explained by the introduction of a new reference compound spectrum in the EXAFS library and LCF, the amorphous Zn phosphate that matches the speciation of Zn in the composts we studied very well. To our knowledge, this is the first evidence for the presence of amorphous zinc phosphate in composted OWs. The presence of such amorphous compounds could be explained by the inhibition of phosphate crystallization due to the presence of large amounts of organic matter in the composts.

### 2.3. The nano-size of ZnS explains its ephemeral nature

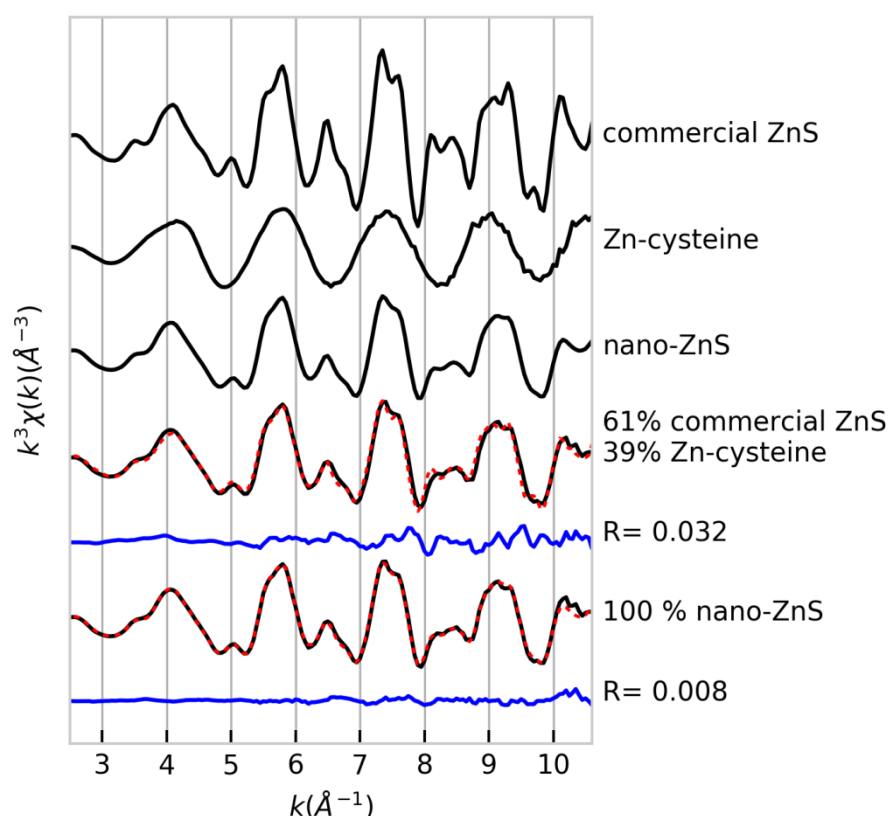


Figure 4: Comparison of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra of Agri-1 digestate, synthesized nano-ZnS and commercial ZnS.

EXAFS spectra of OW samples containing ZnS strongly resembled nano-ZnS reference spectra. Figure 4 shows that oscillations at 5, 6.5, 8.5 and after 10 Å<sup>-1</sup> are much less intense for the Agri-1 digestate spectrum than for commercial ZnS. Visually, Agri-1 digestate spectrum is very similar to the nano-ZnS spectrum and this similarity was observed in all OWs containing ZnS (Figure S7). In addition, the nano-ZnS reference compound was



always selected by LCF calculation to model the experimental signal unlike the commercial ZnS compound, which was never selected (Table S1 for detailed results of LCF). The EXAFS signal for nano-ZnS had smaller oscillations than the commercial ZnS due to a smaller number of Zn atoms in the second coordination shell. Indeed, the contribution of under-coordinated Zn atoms located at the surface to the EXAFS signal increases with a decrease in particle size. Thus when we detected ZnS in raw OWs and digestates, we suspected ZnS would be nano-sized.

As the EXAFS technique gives averaged information on Zn local environment, this nano-ZnS EXAFS signature probably reflects the average distribution of ZnS of different sizes and crystallinities that is equivalent, on average, to the 3 nm-nano-ZnS reference used in this study. Indeed, the less intense EXAFS oscillations for the Agri-1 digestate compared to commercial ZnS could be due to the presence of both crystalline ZnS (such as commercial ZnS) and Zn-cysteine, which is less structured. This combination was tested by LCF to fit Agri-1 and indicated a significantly higher residue (+300%) than the fit with nano-ZnS (Figure 4).

Legros *et al.* (2017) also used a nano-ZnS reference spectrum to model OW spectra of lab-scale raw OWs and digestates composed of pig slurry, sewage sludge and municipal wastes. Our results extend the observation of a nano-ZnS signature in raw OWs and digestates from different origins and for samples taken from full-scale plants. The previous imaging of nano-ZnS (2.5 to 7.5 nm) in digested sewage sludge by Kim *et al.* (2014) reinforces the hypothesis of the presence of nano-ZnS in OW samples.

Anaerobic digestion and anaerobic storage of OW create environmental conditions that are favorable for nano-ZnS precipitation. For example, sulfate-reducing bacteria (SRB) can be present in AD digesters because of anaerobic conditions and high sulfate concentration (Chen *et al.*, 2008). Nano-ZnS has been observed in in-situ biofilms containing a majority of SRB (Moreau *et al.*, 2004; Moreau *et al.*, 2007). The presence of SRB in liquid medium can also cause precipitation of nano-ZnS with crystalline defects (Xu *et al.*, 2016). The mechanism of SRB influence on nano-ZnS precipitation is not known and might be specific to SRB or an indirect mechanism. Indeed, organic compounds found in bacterial medium or synthesized by bacteria also influence the size of ZnS-particles. For example, simple organic compounds (cysteine and histidine) have been shown to limit ZnS particle growth (Gondikas *et al.*, 2012; Kaur *et al.*, 2015). Thus, nano-ZnS precipitation in OW is consistent with these previous in-situ observations and bench-scale experiments with SRB and organic compounds.

The drastic change in Zn speciation from a majority of nano-ZnS in raw OWs and digestates to a majority of Am-Zn-phosphate in some solid digestates and in all the composts (Figure 2, Table S1) reveals the low stability of nano-ZnS. Some authors already demonstrated that ZnS formed in OW are much less stable after full-scale or bench-scale composting (Nagoshi *et al.*, 2005; Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012). This behavior is unexpected compared to what is observed with macroscopic ZnS (i.e. sphalerite).

Indeed, sphalerite has been shown to remain stable in the soil for years. Only 0.5% of spiked natural sphalerite had dissolved after one year of incubation in the soil (Robson *et al.*, 2014). Voegelin *et al.* (2011) observed 26 to 97% of dissolution of commercial 25-40 nm (crystallite size) ZnS spiked in four different soils after four years.

The low stability of nano-ZnS particles in OWs is probably explained by their small size. Indeed, nanoparticles have a higher proportion of atoms at the surface, making them more reactive and prone to oxidative dissolution. Moreover, for a size of 3.4 nm, Gilbert *et al.* (2004) showed that nano-ZnS present structural disorder which can increase surface reactivity (Waychunas et Zhang, 2008) and enhance oxidative dissolution. Since ZnS were identified as particles with an average crystallite diameter of about 3 nm in OWs in this study, we assume that the nano-sized ZnS formed in OW explain their instability as soon as they are exposed to aerobic conditions.

## 2.4. Environmental implications

Since Zn speciation determines its availability in amended soil (Tella *et al.*, 2016), it is crucial to assess Zn speciation in OWs before spreading in order to better predict the fate of Zn in soil. OWs are spread on cultivated soil as fertilizer in raw, digested and/or composted form. Our study evidences the impact of treatment on Zn speciation. Nano-ZnS is the main phase in OWs characterized by reducing conditions (digestates, liquid OWs, liquid digestates, fresh solid digestates). Very few studies have assessed the fate of this species in the soil after OW spreading. Formentini *et al.* (2017) showed that after spreading of pig slurry, in which nano-ZnS accounted for 100% of the Zn speciation, on a clay soil, all the Zn accumulated in the top 30 cm and was distributed between Zn-OM (41%), Zn-kaolinite (38%) and Zn-FeOx (23%). Zn applied to the soil via pig slurry spreading was no longer present in the form of nano-ZnS. Isaure *et al.* (2005) found that Zn originating from the dissolution of ZnS formed in a sediment was mostly present as Zn sorbed to ferrihydrite in a calcareous and silty soil 18 months after deposition of the sediment on the soil. Thus, soil characteristics appear to influence the fate of Zn after dissolution of nano-ZnS, as shown by Voegelin *et al.* (2011).

Amorphous Zn-phosphate is the main phase in samples that have been exposed to oxygen due to their high DM content and storage conditions (solid OWs, composted digestates and OWs, stockpiled solid digestates) followed by Zn sorbed to ferrihydrite. To our knowledge, no results are available about the fate of amorphous zinc phosphate in soil since this phase has not previously been evidenced. Regarding Zn sorbed to ferrihydrite, Tella *et al.* (2016) showed that Zn availability increases in OWs-amended clay soil. Zn speciation in these OWs was dominated by Zn sorbed to ferrihydrite and Zn desorption from Fe oxides has been suggested as the mechanism behind the release of Zn in soil solution. Unfortunately, such studies are still scarce and do not cover all the characteristics/properties of the soils that can interact with the fate of TEs. However, the present study provides general trends about the influence of treatments on Zn speciation

that could be used for decision-making to limit the environmental impact of agricultural recycling.

## Associated content

**Supporting Information.** Results on the influence of sample handling on Zn K-edge EXAFS spectrum; Characterization of reference compounds used for linear combination fitting of Zn K-edge EXAFS spectra; Detailed results of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy linear combination fitting.

## Author information

Corresponding Author. Maureen Le Bars \* [maureenlebars@gmail.com](mailto:maureenlebars@gmail.com)

## Acknowledgements

The authors wish to thank J.P. Delgenes, D. Patureau, N. Sertillanges, S. Houot, D. Montenach, A. Savoie (INRA), M. Montès, C. Chevassut-Rosset (CIRAD) who provided us with the samples and considerable advice on sample selection. The authors are grateful to French Environment and Energy Management Agency (ADEME) and the French Agricultural Research Centre for International Development (CIRAD) for funding the PhD scholarship of Maureen Le Bars. This study was part of the DIGESTATE project, funded by ANR (*Agence Nationale de la Recherche*, France) under Grant ANR-15-CE34-0003-01. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility (ESRF) and Stanford Synchrotron Radiation Light- source (SSRL) for provision of synchrotron radiation facilities. Use of the SSRL, SLAC National Accelerator Laboratory, was supported by the U.S. Department of Energy, Office of Science, Office of Basic Energy Sciences under Contract No. DE-AC02- 76SF00515. The authors declare no competing financial interest.

## References

- Al Seadi, T., Drosch, B., Fuchs, W., Rutz, D., Janssen, R. (2013). Biogas digestate quality and utilization. In A. Wellinger, Murphy, J., Baxter, D. (Ed.), *The Biogas Handbook – Science, Production and Applications*, (pp. 267-301). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Alburquerque, J. A., de la Fuente, C., Ferrer-Costa, A., Carrasco, L., Cegarra, J., Abad, M., Bernal, M. P. (2012). Assessment of the fertiliser potential of digestates from farm and agroindustrial residues. *Biomass and Bioenergy*, 40, 181-189.
- Alonso-Blázquez, N., García-Gómez, C., Fernández, M. D. (2015). Influence of Zn-contaminated soils in the antioxidative defence system of wheat (*Triticum aestivum*) and maize (*Zea mays*) at different exposure times: potential use as biomarkers. *Ecotoxicology*, 24(2), 279-291.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10), 634-641.
- Bach, S., Celinski, V. R., Dietzsch, M., Panthofer, M., Bienert, R., Emmerling, F., Schmedt auf der Gunne, J., Tremel, W. (2015). Thermally highly stable amorphous zinc phosphate intermediates during the formation of zinc phosphate hydrate. *Journal of the American Chemical Society*, 137(6), 2285-2294.
- Belon, E., Boisson, M., Deportes, I., Eglin, T., Feix, I., Bispo, A., Galsomies, L., Leblond, S., Guellier, C. (2012). An inventory of trace elements inputs to French agricultural soils. *Science of the Total Environment*, 439, 87-95.
- Birks, L. S., Friedman, H. (1946). Particle Size Determination from X-Ray Line Broadening. *Journal of applied physics*, 17(8), 687-692.
- Brehler B., Wedepohl, K. H. (1978). Zinc. In K. Wedepohl (Ed.), *Handbook of Geochemistry* (Vol. II/3). Berlin: Springer-Verlag.
- Chaudri, A. M., Allain, C. M. G., Barbosa-Jefferson, V. L., Nicholson, F. A., Chambers, B. J., McGrath, S. P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil*, 221(2), 167-179.
- Chen, Y., Cheng, J. J., Creamer, K. S. (2008). Inhibition of anaerobic digestion process: a review. *Bioresource technology*, 99(10), 4044-4064.
- Collin, B., Doelsch, E. (2010). Impact of high natural soilborne heavy metal concentrations on the mobility and phytoavailability of these elements for sugarcane. *Geoderma*, 159(3-4), 452-458.
- Doelsch, E., Basile-Doelsch, I., Rose, J., Masion, A., Borschneck, D., Hazemann, J.-L., Saint Macary, H., Bottero, J.-Y. (2006). New combination of EXAFS spectroscopy and density fractionation for the speciation of chromium within an andosol. *Environmental science & technology*, 40(24), 7602-7608.
- Donner, E., Brunetti, G., Zarcinas, B., Harris, P., Tavakkoli, E., Naidu, R., Lombi, E. (2013). Effects of Chemical Amendments on the Lability and Speciation of Metals in Anaerobically Digested Biosolids. *Environmental science & technology*, 47(19), 11157-11165.
- Donner, E., Howard, D. L., Jonge, M. D. d., Paterson, D., Cheah, M. H., Naidu, R., Lombi, E. (2011). X-ray Absorption and Micro X-ray Fluorescence Spectroscopy Investigation of Copper and Zinc Speciation in Biosolids. *Environmental science & technology*, 45(17), 7249-7257.

- Formentini, T. A., Legros, S., Fernandes, C. V. S., Pinheiro, A., Le Bars, M., Levard, C., Mallmann, F. J. K., Da Veiga, M., Doelsch, E. (2017). Radical change of Zn speciation in pig slurry amended soil: Key role of nano-sized sulfide particles. *Environmental Pollution*, 222, 495-503.
- Gelabert, A., Sivry, Y., Gobbi, P., Mansouri-Guilani, N., Menguy, N., Brayner, R., Siron, V., Benedetti, M. F., Ferrari, R. (2016). Testing nanoeffect onto model bacteria: Impact of speciation and genotypes. *Nanotoxicology*, 10(2), 216-225.
- Gilbert, B., Huang, F., Zhang, H., Waychunas, G. A., Banfield, J. F. (2004). Nanoparticles: Strained and Stiff. *Science*, 305(5684), 651-654.
- Gomez, C. D. C. (2013). Biogas as an energy option: an overview. In A. Wellinger, Murphy, J., Baxter, D. (Ed.), *The Biogas Handbook: Science, Production and Applications* (pp. 1-15). Cambridge: Woodhead Publishing Limited.
- Gondikas, A. P., Masion, A., Auffan, M., Lau, B. L. T., Hsu-Kim, H. (2012). Early-stage precipitation kinetics of zinc sulfide nanoclusters forming in the presence of cysteine. *Chemical Geology*, 329, 10-17.
- Hammer, D., Keller, C., McLaughlin, M. J., Hamon, R. E. (2006). Fixation of metals in soil constituents and potential remobilization by hyperaccumulating and non-hyperaccumulating plants: Results from an isotopic dilution study. *Environmental Pollution*, 143(3), 407-415.
- Hoornweg, D., P., B.-T., Kennedy, C. (2013). Waste production must peak this century. *Nature*, 502(7473), 615-617.
- Isaure, M.-P., Manceau, A., Geoffroy, N., Laboudigue, A., Tamura, N., Marcus, M. A. (2005). Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 69(5), 1173-1198.
- Jin, X. F., Yang, X. E., Islam, E., Liu, D., Mahmood, Q., Li, H., Li, J. (2008). Ultrastructural changes, zinc hyperaccumulation and its relation with antioxidants in two ecotypes of *Sedum alfredii* Hance. *Plant Physiology and Biochemistry*, 46(11), 997-1006.
- Kaur, J., Sharma, M., Pandey, O. P. (2015). Effect of pH on Size of ZnS Nanoparticles and Its Application for Dye Degradation. *Particulate Science and Technology*, 33(2), 184-188.
- Khalid, A., Arshad, M., Anjum, M., Mahmood, T., Dawson, L. (2011). The anaerobic digestion of solid organic waste. *Waste management*, 31(8), 1737-1744.
- Kim, B., Levard, C., Murayama, M., Brown, G. E., Hochella, M. F. (2014). Integrated Approaches of X-Ray Absorption Spectroscopic and Electron Microscopic Techniques on Zinc Speciation and Characterization in a Final Sewage Sludge Product. *Journal of Environmental Quality*, 43(3), 908-916.
- Knoop, C., Dornack, C., Raab, T. (2017a). Nutrient and heavy metal accumulation in municipal organic waste from separate collection during anaerobic digestion in a two-stage laboratory biogas plant. *Bioresource technology*, 239, 437-446.
- Knoop, C., Tietze, M., Dornack, C., Raab, T. (2017b). Fate of nutrients and heavy metals during two-stage digestion and aerobic post-treatment of municipal organic waste. *Bioresource technology*, 251, 238-248.
- Leclerc, A., Laurent, A. (2017). Framework for estimating toxic releases from the application of manure on agricultural soil: National release inventories for heavy metals in 2000-2014. *Science of the total environment*, 590, 452-460.
- Legros, S., Chaurand, P., Rose, J. r., Masion, A., Briois, V., Ferrasse, J.-H., Macary, H. S., Bottero, J.-Y., Doelsch, E. (2010a). Investigation of copper speciation in pig slurry

- by a multitechnique approach. *Environmental science & technology*, 44(18), 6926-6932.
- Legros, S., Doelsch, E., Masion, A., Rose, J., Borshneck, D., Proux, O., Hazemann, J. L., Saint-Macary, H., Bottero, J. Y. (2010b). Combining Size Fractionation, Scanning Electron Microscopy, and X-ray Absorption Spectroscopy to Probe Zinc Speciation in Pig Slurry. *Journal of Environmental Quality*, 39(2), 531-540.
- Legros, S., Levard, C., Marcato-Romain, C. E., Guisresse, M., Doelsch, E. (2017). Anaerobic Digestion Alters Copper and Zinc Speciation. *Environmental science & technology*, 51(18), 10326-10334.
- Lombi, E., Donner, E., Tavakkoli, E., Turney, T. W., Naidu, R., Miller, B. W., Scheckel, K. G. (2012). Fate of Zinc Oxide Nanoparticles during Anaerobic Digestion of Wastewater and Post-Treatment Processing of Sewage Sludge. *Environmental science & technology*, 46(16), 9089-9096.
- Möller, K., Müller, T. (2012). Effects of anaerobic digestion on digestate nutrient availability and crop growth: A review. *Engineering in Life Sciences*, 12(3), 242-257.
- Moreau, J. W., Webb, R. I., Banfield, J. F. (2004). Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. *American Mineralogist*, 89(7), 950-690.
- Moreau, J. W., Weber, P. K., Martin, M. C., Gilbert, B., Hutcheon, I. D., Banfield, J. F. (2007). Extracellular Proteins Limit the Dispersal of Biogenic Nanoparticles. *Science*, 316(5831), 1600-1603.
- Nagoshi, M., Kawano, T., Fujiwara, S., Miura, T., Udagawa, S., Nakahara, K., Takaoka, M., Uruga, T. (2005). Chemical states of trace heavy metals in sewage sludge by XAFS spectroscopy. *Physica Scripta*, 2005(T115), 946.
- Nicholson, F., Chambers, B., Williams, J., Unwin, R. (1999). Heavy metal contents of livestock feeds and animal manures in England and Wales. *Bioresource technology*, 70(1), 23-31.
- Nkoa, R. (2014). Agricultural benefits and environmental risks of soil fertilization with anaerobic digestates: a review. *Agronomy for Sustainable Development*, 34(2), 473-492.
- Nolan, A. L., Lombi, E., McLaughlin, M. J. (2003). Metal bioaccumulation and toxicity in soils—why bother with speciation? *Australian Journal of Chemistry*, 56(3), 77-91.
- Pathak, A., Dastidar, M. G., Sreekrishnan, T. R. (2009). Bioleaching of heavy metals from sewage sludge: a review. *Journal of Environmental Management*, 90(8), 2343-2353.
- Peltier, E., Ilipilla, P., Fowle, D. (2011). Structure and reactivity of zinc sulfide precipitates formed in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Applied geochemistry*, 26(9-10), 1673-1680.
- Pokrovsky, O. S., Pokrovski, G. S., Gélabert, A., Schott, J., Boudou, A. (2005). Speciation of Zn associated with diatoms using X-ray absorption spectroscopy. *Environmental science & technology*, 39(12), 4490-4498.
- Ravel, B., Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of synchrotron radiation*, 12(4), 537-541.
- Robson, T. C., Braungardt, C. B., Rieuwerts, J., Worsfold, P. (2014). Cadmium contamination of agricultural soils and crops resulting from sphalerite weathering. *Environmental Pollution*, 184, 283-289.

- Romeo, A., Vacchina, V., Legros, S., Doelsch, E. (2014). Zinc fate in animal husbandry systems. *Metallomics*, 6(11), 1999-2009.
- Rose, J., Moulin, I., Masion, A., Bertsch, P. M., Wiesner, M. R., Bottero, J.-Y., Mosnier, F., Haehnel, C. (2001). X-ray absorption spectroscopy study of immobilization processes for heavy metals in calcium silicate hydrates. 2. Zinc. *Langmuir*, 17(12), 3658-3665.
- Sammut, M., Rose, J., Masion, A., Fiani, E., Depoux, M., Ziebel, A., Hazemann, J., Proux, O., Borschneck, D., Noack, Y. (2008). Determination of zinc speciation in basic oxygen furnace flying dust by chemical extractions and X-ray spectroscopy. *Chemosphere*, 70(11), 1945-1951.
- Saveyn, H., Eder, P., Garbarino, E., Muchova, L., Hjelmar, O., van der Sloot, H., Comans, R., van Zomeren, A., Hyks, J., Oberender, A. (2014). *Study on methodological aspects regarding limit values for pollutants in aggregates in the context of the possible development of end-of-waste criteria under the EU Waste Framework Directive*
- Smith, S. R. (2009). A critical review of the bioavailability and impacts of heavy metals in municipal solid waste composts compared to sewage sludge. *Environment international*, 35(1), 142-156.
- Tambone, F., Genevini, P., D'Imporzano, G., Adani, F. (2009). Assessing amendment properties of digestate by studying the organic matter composition and the degree of biological stability during the anaerobic digestion of the organic fraction of MSW. *Bioresource technology*, 100(12), 3140-3142.
- Tampio, E., Salo, T., Rintala, J. (2016). Agronomic characteristics of five different urban waste digestates. *Journal of Environmental Management*, 169, 293-302.
- Tella, M., Bravin, M. N., Thuriès, L., Cazevieille, P., Chevassus-Rosset, C., Collin, B., Chaurand, P., Legros, S., Doelsch, E. (2016). Increased zinc and copper availability in organic waste amended soil potentially involving distinct release mechanisms. *Environmental Pollution*, 212, 299-306.
- Voegelin, A., Jacquat, O., Pfister, S., Barmettler, K., Scheinost, A. C., Kretzschmar, R. (2011). Time-Dependent Changes of Zinc Speciation in Four Soils Contaminated with Zincite or Sphalerite. *Environmental science & technology*, 45(1), 255-261.
- Wang, C., Zhang, S. H., Wang, P. F., Hou, J., Zhang, W. J., Li, W., Lin, Z. P. (2009). The effect of excess Zn on mineral nutrition and antioxidative response in rapeseed seedlings. *Chemosphere*, 75(11), 1468-1476.
- Waychunas, G. A., Zhang, H. (2008). Structure, Chemistry, and Properties of Mineral Nanoparticles. *Elements*, 4(6), 381-387.
- Xu, J., Murayama, M., Roco, C. M., Veeramani, H., Marc Michel, F., Donald Rimstidt, J., Winkler, C., Hochella Jr, M. F. (2016). Highly-Defective Nanocrystals of ZnS Formed via Dissimilatory Bacterial Sulfate Reduction: a Comparative Study with their Abiogenic Analogues. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 180, 1-14.
- Zirkler, D., Peters, A., Kaupenjohann, M. (2014). Elemental composition of biogas residues: Variability and alteration during anaerobic digestion. *Biomass and Bioenergy*, 67, 89-98.

## Annexe: Supporting information

Number of pages: 15

Number of figures: 9

Number of tables: 1

### SI-1: Influence of freeze drying process on Zn K-edge EXAFS spectrum

The “fresh sample” to be compared with the freeze-dried sample was prepared as follows: the digestate sample from Urban-2 was defrosted under N<sub>2</sub> atmosphere and ultracentrifuged at 50,000g for 3 hours at 4 °C. The centrifugation pellet was collected under N<sub>2</sub> atmosphere and stored in a sealed glass flask until analysis. According to our results, freeze-drying had no effect on Zn speciation in OW (Figure S1).

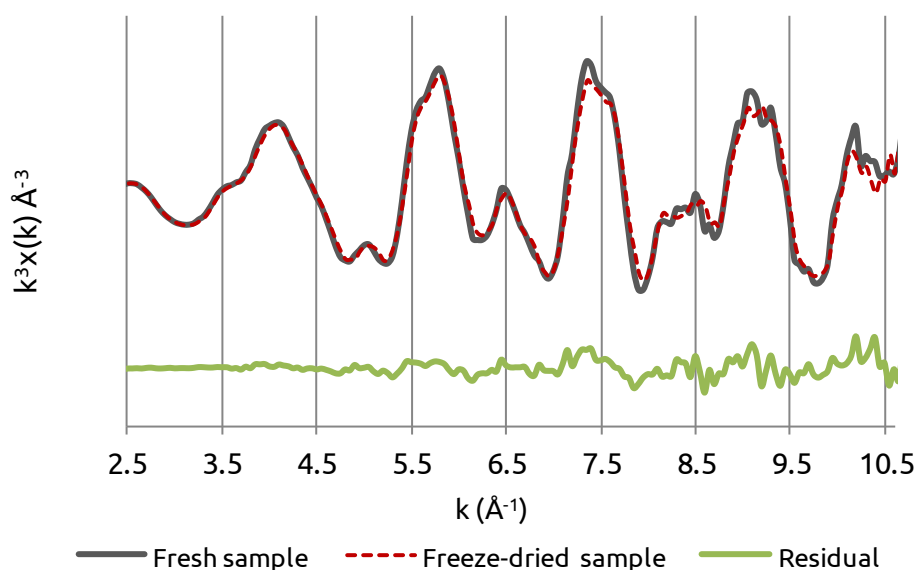


Figure S 1: Comparison of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra of fresh and freeze-dried digestate from Urban-2

### SI-2: Influence of aging of freeze-dried sample on Zn speciation

To study changes in Zn speciation in the sample during aging after freeze-drying, the raw OW sample from Urban-1 was duplicated and aged at room temperature for different periods (3 weeks, 6 months, 1 year). This sample was compared with the same sample stored at -20 °C after freeze-drying, called “non-aged sample”.



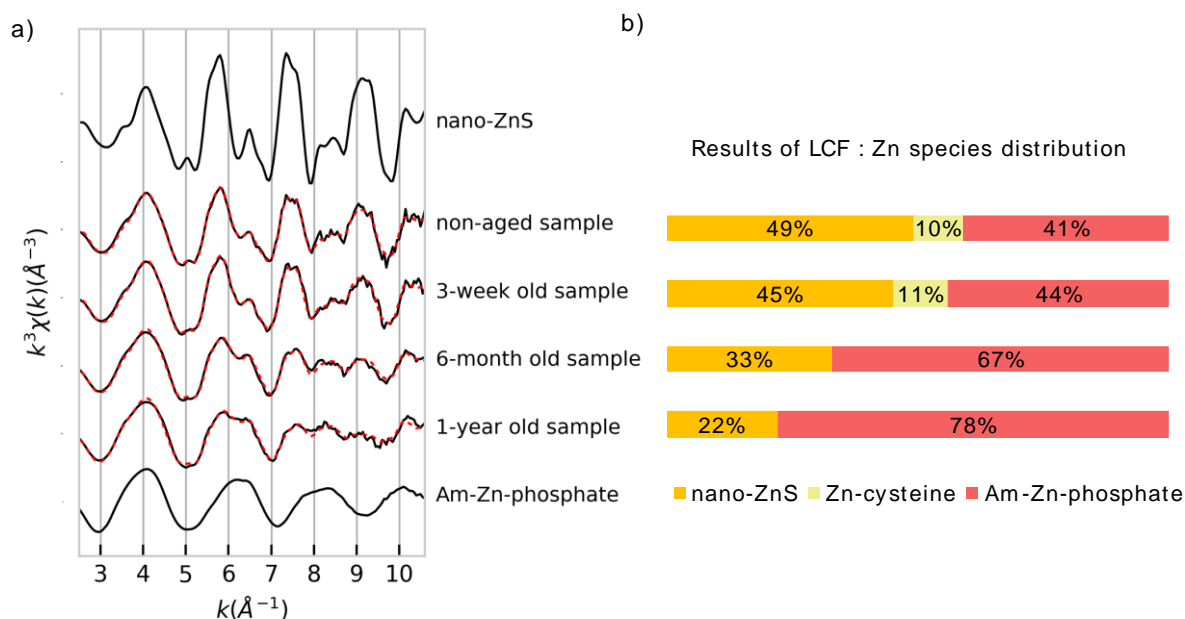


Figure S 2: (a) Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra and (b) Linear Combination Fitting results for Raw OW of Urban-1 after different sample aging durations. Nano-ZnS and Am-Zn-phosphate spectra are given for comparison.

Figure S 2 shows changes in Zn speciation after different aging periods of the raw OW sample from Urban-1. The non-aged freeze-dried sample is considered as representing the unchanged Zn speciation, i.e. 49% nano-ZnS, 41% Amorphous-Zn-phosphate and 10% Zn-cysteine. No change in the EXAFS spectra of the samples was observed after 3 weeks. Changes in Zn speciation became apparent after 6 months and 1 year of aging. Nano-ZnS EXAFS features were much less apparent (e.g. at 6.5 and 8.5  $\text{\AA}^{-1}$ ) and spectra tended to resemble the amorphous Zn-phosphate model compound spectrum, which was confirmed by the LCF results. This indicates that nano-ZnS initially present in raw OWs are quickly altered during sample aging in ambient conditions, even when the sample was previously freeze-dried. The importance of the aging conditions of the samples has been described by Priadi *et al.* (2012). The influence of sample aging on Zn speciation could explain the low proportion of nano-ZnS measured in a previous study (Legros *et al.*, 2017) compared to our results. To avoid any further change in speciation during storage of OW samples before EXAFS analyses, we recommend immediate freezing after sampling and storage at -20 °C prior to analysis. Indeed, EXAFS spectra of raw OW from Urban-1 were compared before and after aging at -20°C and no evolution was observed (Figure S 3).

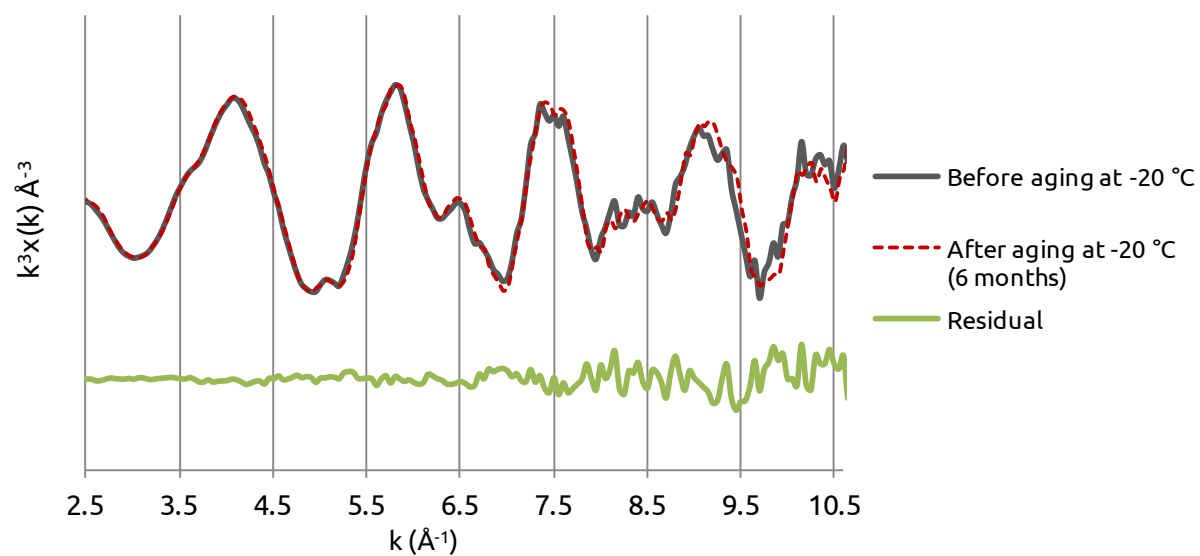


Figure S 3: Comparison of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra for Urban-1 raw waste before and after 6 months of aging at -20 °C.

### SI-3: Reference compounds for linear combination fitting

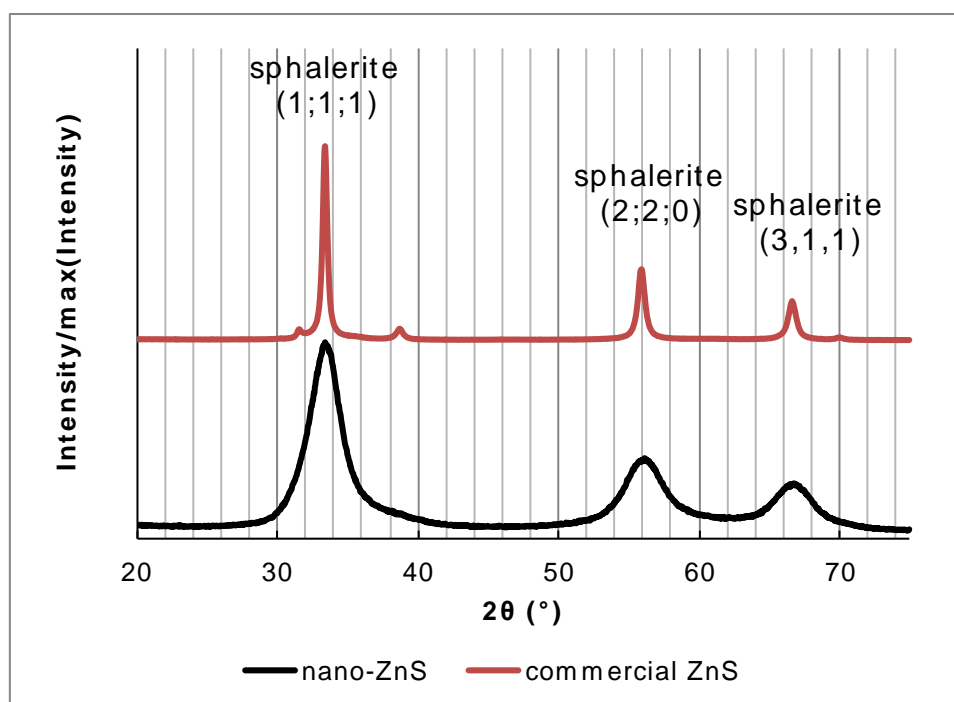


Figure S4: X-ray diffraction pattern of nano-ZnS and commercial ZnS measured with X'Pert PRO PANalytical,  $\lambda = 1.789 \text{ \AA}$  (Co  $K\alpha$ )

The position of diffraction peaks of commercial ZnS and synthesized nano-ZnS is in agreement with the position of the sphalerite peaks (Figure S4). The fact the peaks of the nano-ZnS are wider than those of the commercial ZnS highlights the smaller crystallite size.

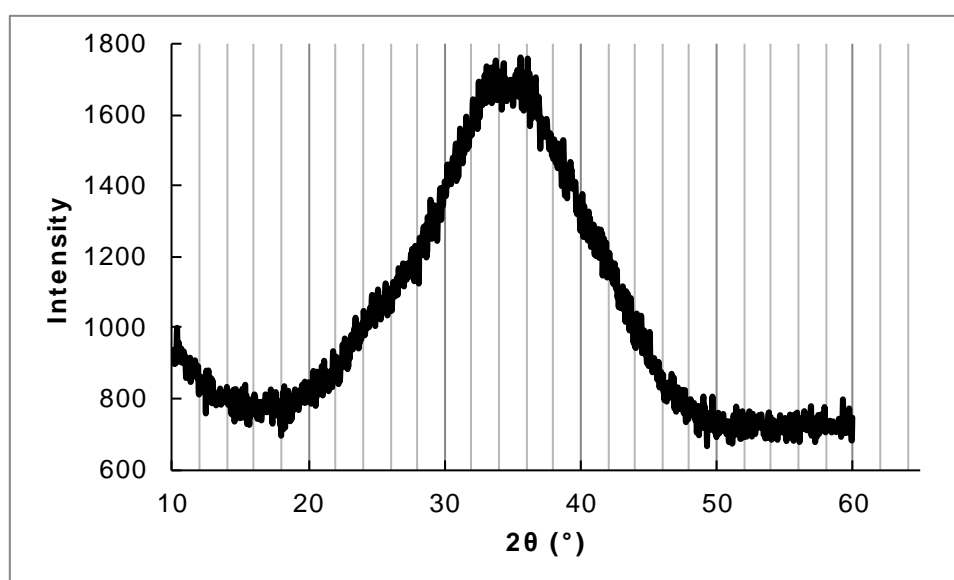


Figure S5: X-ray diffraction pattern of Am-Zn-phosphate measured with X-pert PRO PANalytical,  $\lambda = 1.789 \text{ \AA}$  (Co  $K\alpha$ )

The corresponding scattering vector,  $q$ , of the max intensity of diffraction peak ( $2\theta = 35^\circ$ ) was  $2.11 \text{ \AA}^{-1}$ , which is in agreement with the results of Bach *et al.* (2015).

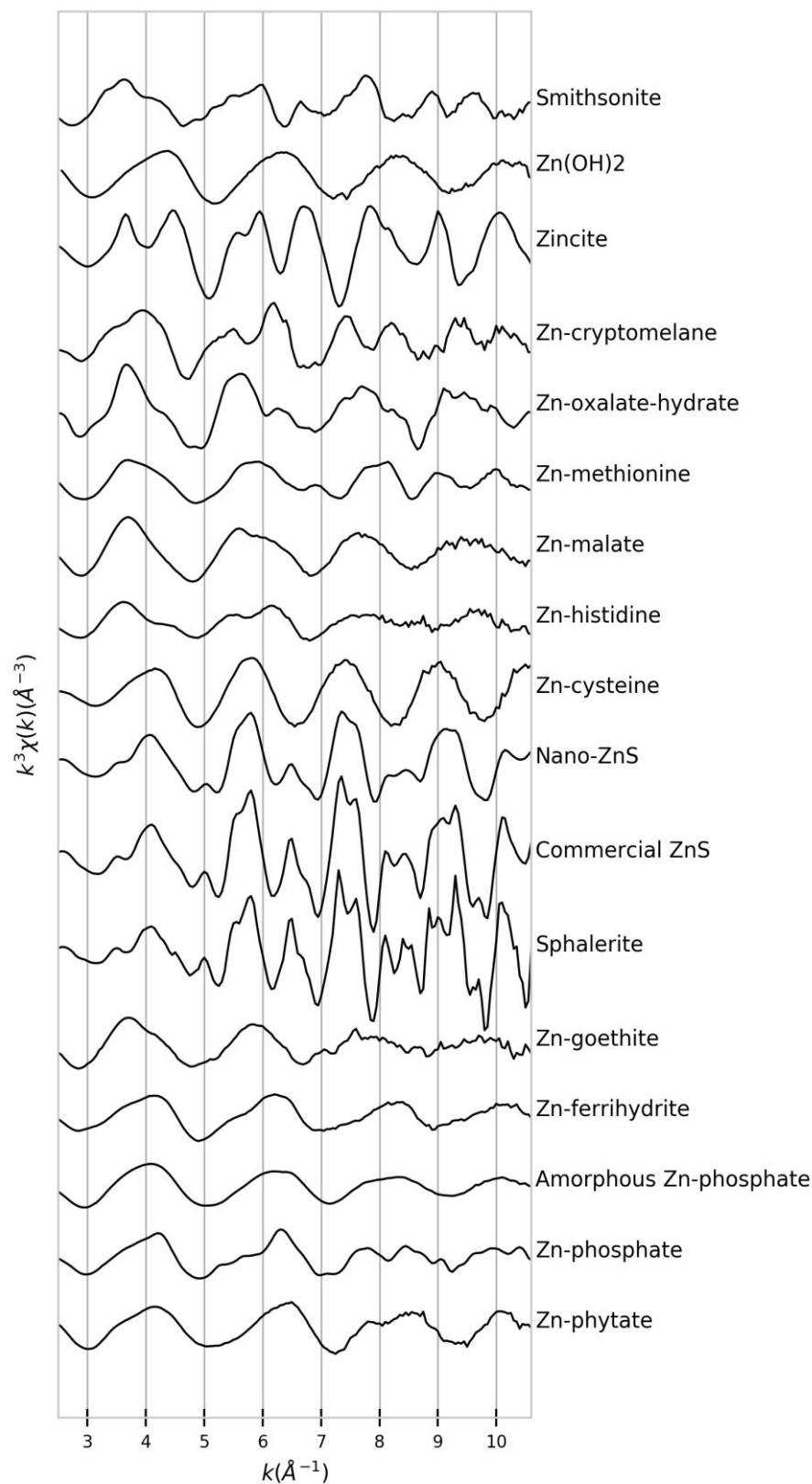
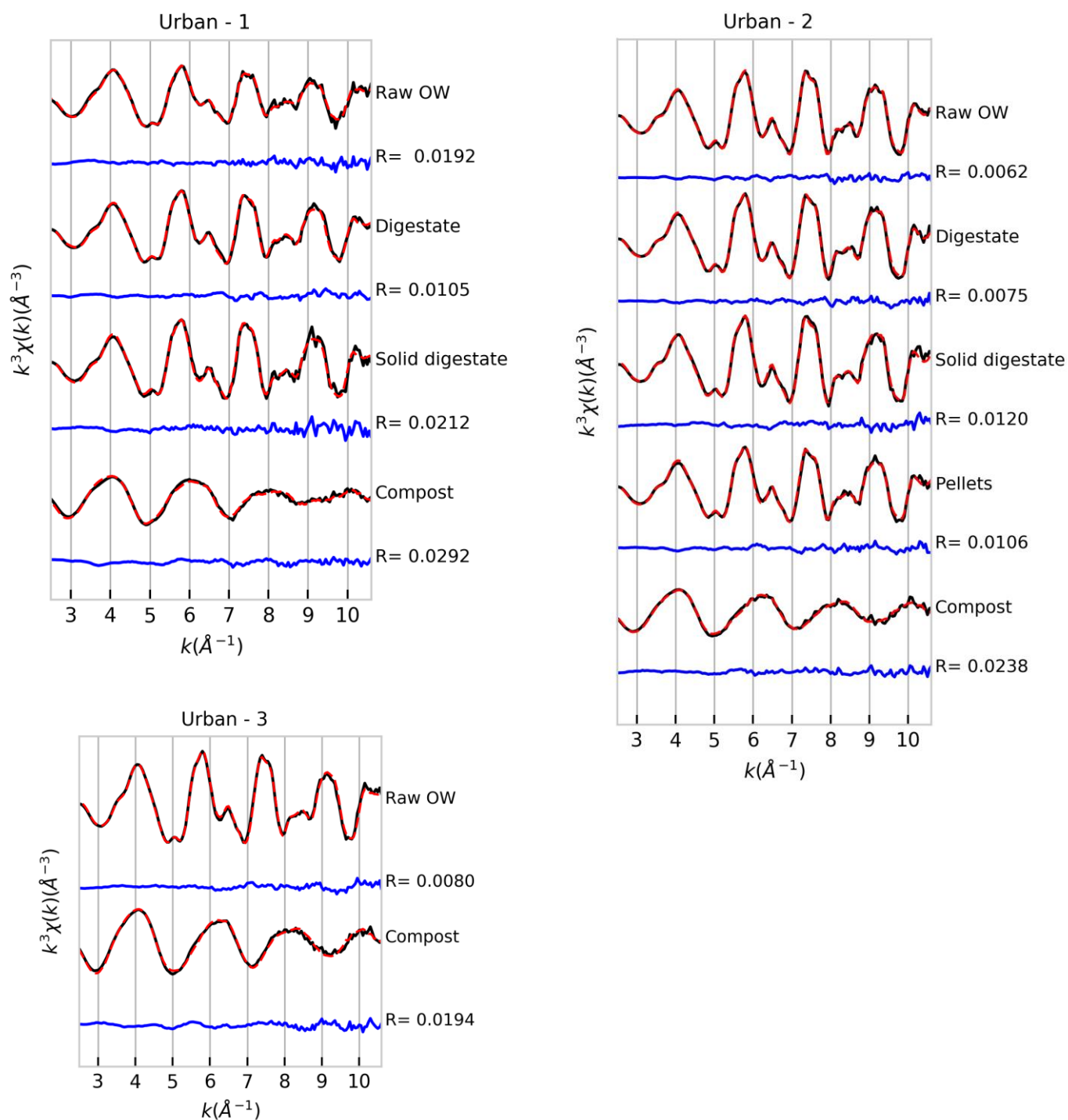
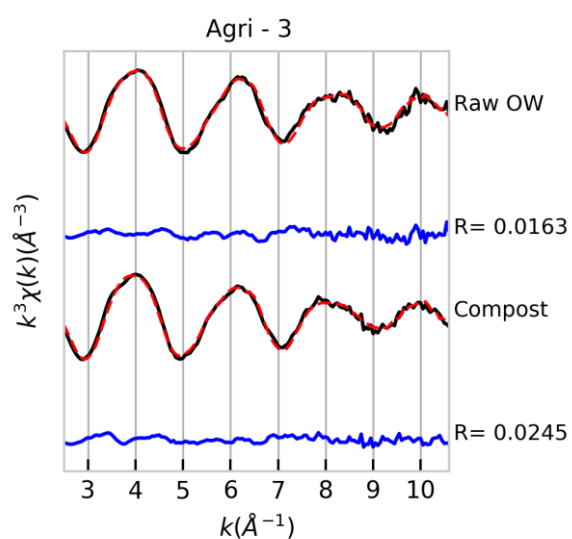
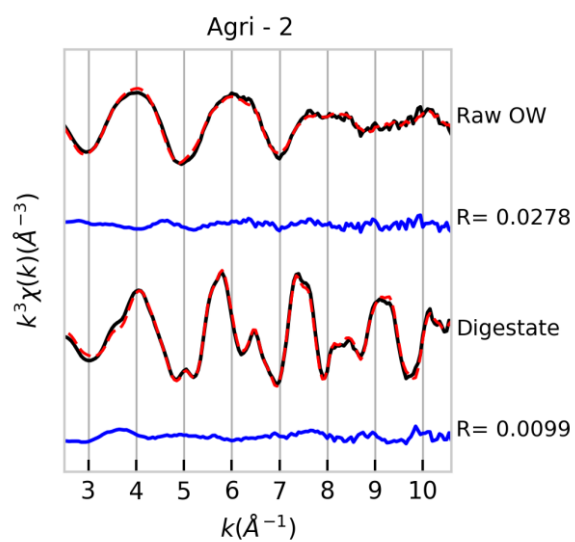
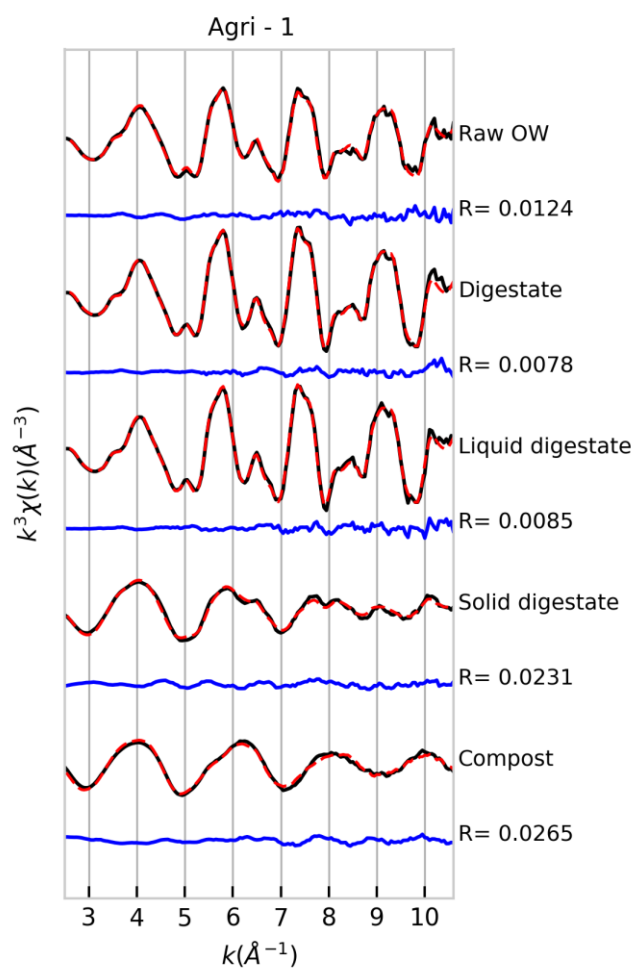


Figure S6: Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra of all reference compounds used for linear combination fitting

## SI-4: Detailed results of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy linear combination fitting





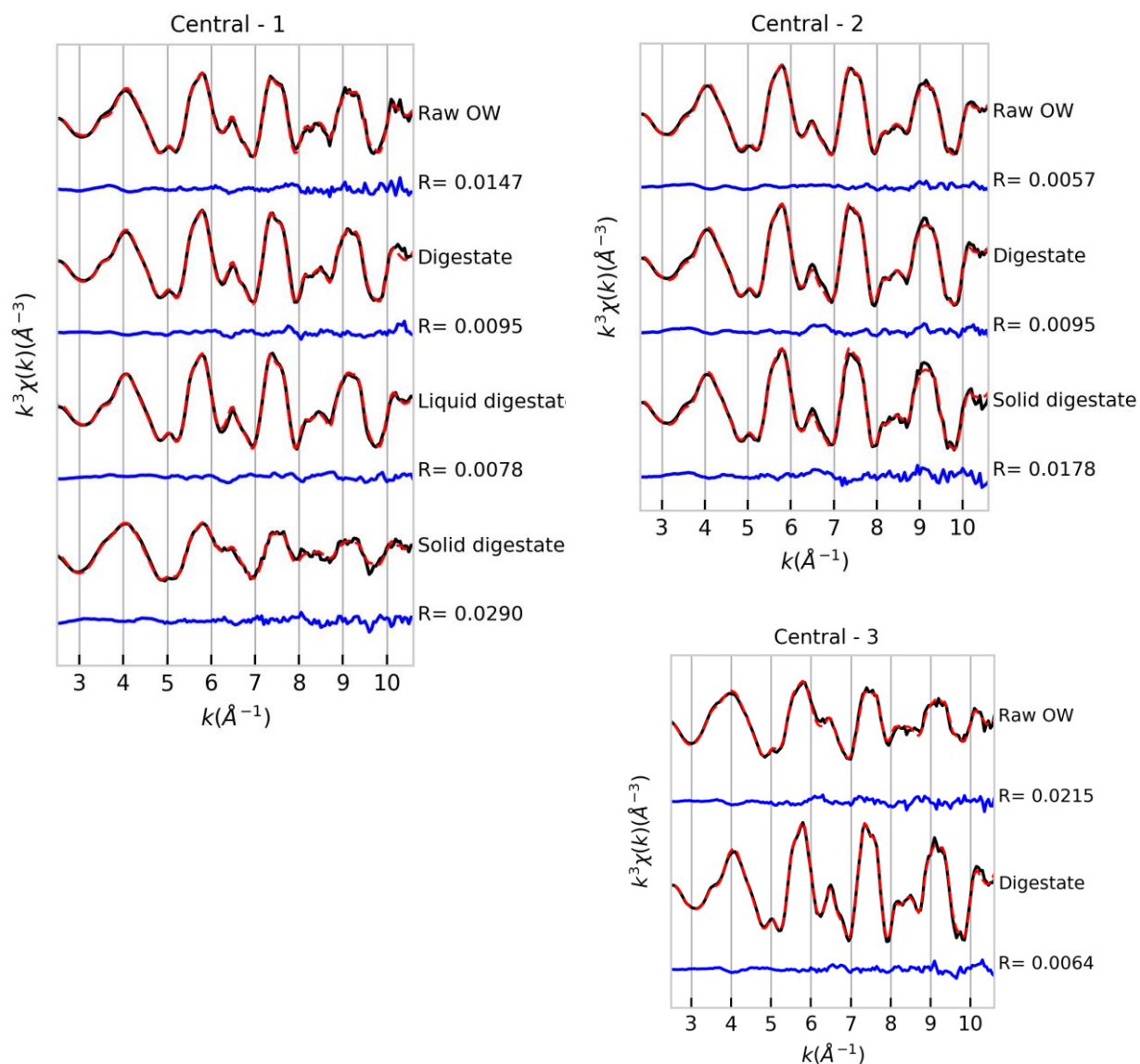


Figure S7: Experimental (black) and modeled (dotted, red) Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra for each sample of organic waste according to the treatment plant concerned. Residual signal (blue) is shown below each experimental signal. R is R-factor calculated  $(\sum (k^3\chi(k)_{exp} - k^3\chi(k)_{fit})^2 / \sum (k^3\chi(k)_{exp})^2)^{1/2}$  between the experimental and modeled signals.

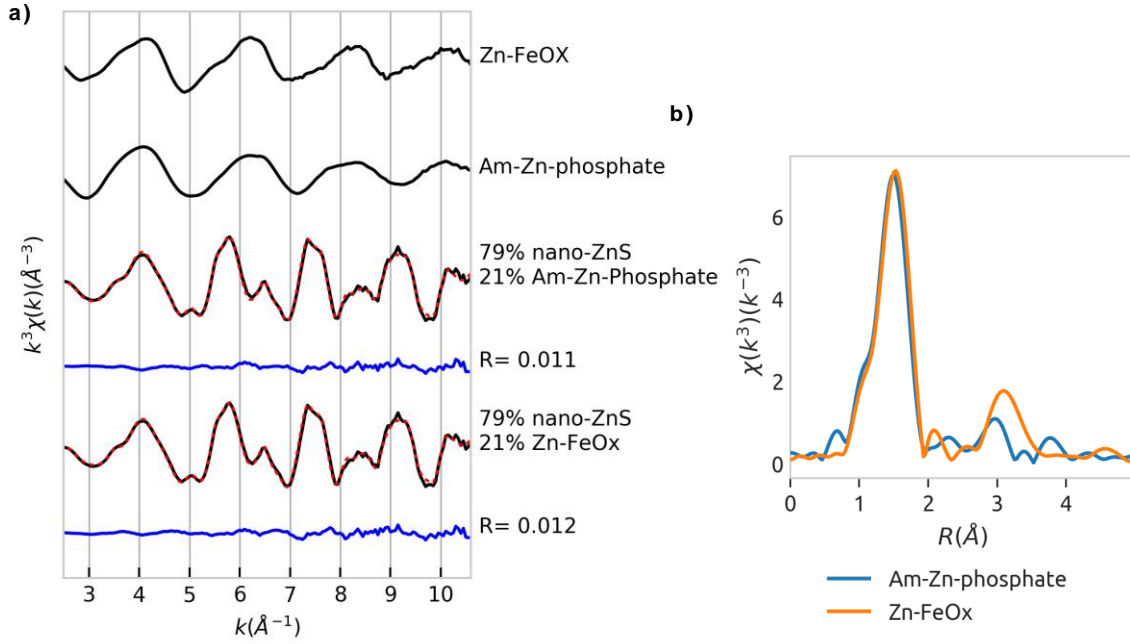


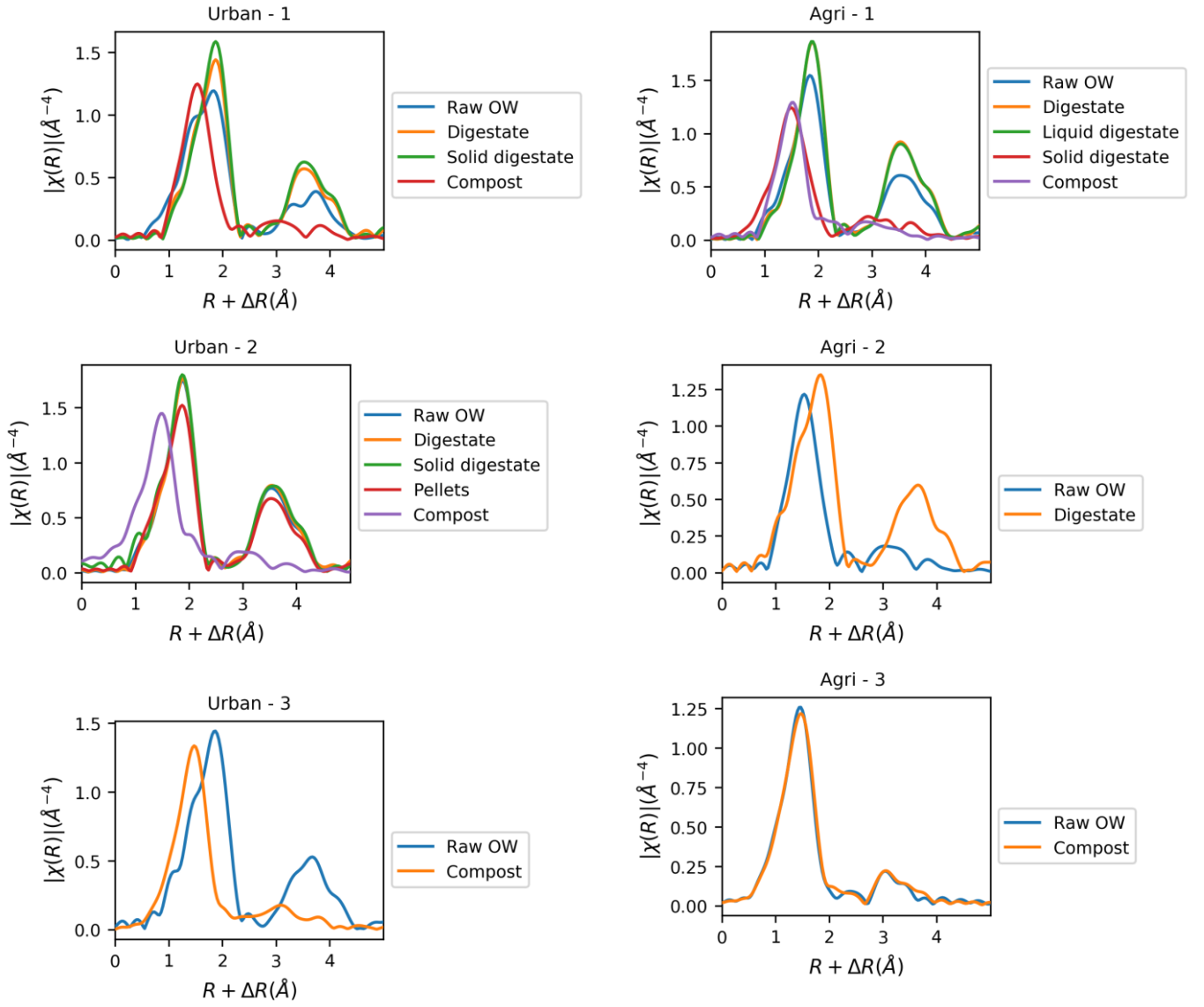
Figure S 8: (a): Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure (EXAFS) spectroscopy spectra of Am-Zn-phosphate and Zn-FeOx references, modeling of EXAFS experimental spectrum of pellets from Urban-2 with 21% Am-Zn-phosphate or 21% Zn-FeOx, with the residual signal shown below the modeled signal.  $R$  is the  $R$ -factor calculated ( $\Sigma(k^3\chi(k)_{exp} - k^3\chi(k)_{fit})^2 / \Sigma(k^3\chi(k)_{exp})^2$ ) between the experimental and modeled signals (b) Fourier transform of EXAFS signals for Am-Zn-phosphate and Zn-FeOx.

Linear combination fitting did not distinguish the reference Zn-FeOx from Am-Zn-phosphate if their contribution was less than 25% (Figure S8(a)).



Table S 1 : Detailed results of linear combination fitting

Site	Step	Nano-ZnS	Am-Zn-phosphate	Zn-FeOx	Zn-methionine	Zn-histidine	Zn-malate	Zn-cysteine	Am-Zn-phosphate or Zn-FeOx	total	R
Urban-1	Raw OW	49%	41%					10%		101%	0.01921
	Digestate	74%		26%						100%	0.01046
	Solid digestate	83%		19%						102%	0.02115
	Compost	10%	39%	35%			15%			99%	0.02924
Urban-2	Raw OW	90%							10%	100%	0.00621
	Digestate	90%							10%	100%	0.00747
	Solid digestate	93%							14%	107%	0.01203
	Pellets	79%							22%	101%	0.0106
Urban-3	Compost		67%	31%						98%	0.02381
	Raw OW	77%	25%							102%	0.00798
Agri-1	Digestate		100%							100%	0.01939
	Raw OW	76%	22%							98%	0.01236
	Digestate	100%								100%	0.00778
	Liquid	100%								100%	0.00848
	Solid	19%	61%		23%					103%	0.02313
Agri-2	Compost		49%	36%			12%			97%	0.02652
	Raw OW	11%	38%	32%			17%			97%	0.02783
Agri-3	Digestate	68%	28%							96%	0.00993
	Raw OW		81%		15%					96%	0.02445
Central-1	Compost		73%				18%			91%	0.01631
	Raw OW	74%							26%	99%	0.01472
	Digestate	85%							17%	102%	0.00952
	Liquid	87%							12%	99%	0.00782
Central-2	Solid	40%	49%				12%			101%	0.02909
	Raw OW	89%							11%	100%	0.00567
	Digestate	100%								100%	0.0095
Central-3	Solid	100%								100%	0.0178
	Raw OW	45%	28%				23%			96%	0.02149
	Digestate	92%							10%	102%	0.0064



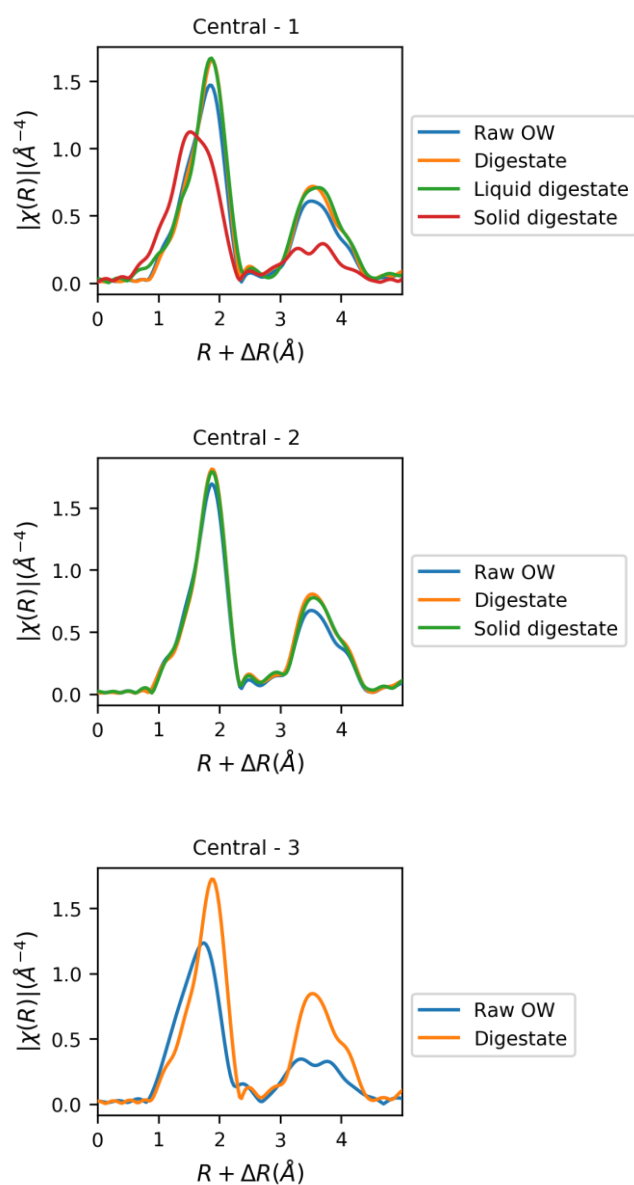


Figure S 9: Fourier transform of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy signal for each organic waste sample, according to the treatment plant concerned

## References

- Bach, S., Celinski, V. R., Dietzsch, M., Panthofer, M., Bienert, R., Emmerling, F., Schmedt auf der Gunne, J., Tremel, W. (2015). Thermally highly stable amorphous zinc phosphate intermediates during the formation of zinc phosphate hydrate. *Journal of the American Chemical Society*, 137(6), 2285-2294.
- Legros, S., Levard, C., Marcato-Romain, C. E., Guirès, M., Doelsch, E. (2017). Anaerobic Digestion Alters Copper and Zinc Speciation. *Environmental science & technology*, 51(18), 10326-10334.
- Priadi, C., Le Pape, P., Morin, G., Ayrault, S., Maillot, F., Juillot, F., Hochreutener, R., Llorens, I., Testemale, D., Proux, O., Brown, G. E. (2012). X-ray Absorption Fine Structure Evidence for Amorphous Zinc Sulfide as a Major Zinc Species in Suspended Matter from the Seine River Downstream of Paris, Ile-de-France, France. *Environmental science & technology*, 46(7), 3712-3720.

## **Chapitre 3 - Propriétés structurales des nano-ZnS : effet des molécules organiques**



## Sommaire

Introduction .....	117
<b>1. Matériel et méthodes .....</b>	<b>118</b>
1.1. Synthèse de nano-ZnS .....	118
1.1.1. Nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques (MO) .....	121
1.1.2. Expérience “in situ” : influence de la cystéine sur la contraction des particules .....	122
1.1.3. Micro-ZnS pour expérience de dissolution .....	122
1.2. Méthodes de caractérisation .....	122
1.2.1. Microscopie électronique à transmission .....	122
1.2.2. Diffraction des rayons X et Diffusion totale des rayons X aux grands angles .....	123
1.2.3. Spectroscopie d’absorption des rayons X (EXAFS) .....	123
1.2.4. Détermination des paramètres de structure des nano-ZnS .....	124
1.2.4.1. Taille MET .....	124
1.2.4.2. Taille minimale (DRX) .....	124
1.2.4.3. Taille maximale (PDF) .....	125
1.2.4.4. Taille moyenne (PDF) .....	125
1.2.4.5. Taille EXAFS .....	125
1.2.4.6. Détermination de la contraction du réseau cristallin .....	126
1.2.4.7. Analyse statistique .....	126
1.2.5. BET .....	126
1.3. Dissolution des nano-ZnS .....	127
<b>2. Résultats et discussion .....</b>	<b>127</b>
2.1. Influence de la taille sur le désordre structural .....	127
2.1.1. Caractérisation multi-échelle: taille des nano-ZnS .....	127
2.1.2. Relation entre taille et contraction du réseau cristallin des nano-ZnS ....	132
2.1.3. Discussion .....	134
2.2. Influence de la matière organique sur la structure des nano-ZnS .....	137
2.2.1. Influence du type de molécule organique .....	137

2.2.1.1. Effet sur la taille .....	138
2.2.1.2. Effet sur la contraction du réseau cristallin .....	139
2.2.2. Interaction avec le groupement thiol .....	141
2.2.2.1. L'effet de l'encombrement stérique de molécule thiolée sur la taille et la contraction du réseau cristallin .....	141
2.2.2.2. Influence de la cystéine sur la contraction du réseau cristallin pour une particule de taille donnée.....	144
2.2.2.3. Effet de la concentration en cystéine sur la taille et la contraction du réseau cristallin .....	145
2.2.3. Discussion .....	147
2.2.3.1. Influence du groupement thiol sur la taille des nano-ZnS.....	147
2.2.3.2. Influence des différentes molécules organiques sur la contraction du réseau cristallin .....	150
2.3. Influence de la taille et de la contrainte sur la cinétique de dissolution des nano-ZnS .....	152
2.3.1. Caractérisation des 3 particules .....	152
2.3.1.1. MET .....	152
2.3.1.2. Taille des cristallites .....	154
2.3.1.3. Contraction du réseau cristallin .....	155
2.3.1.4. Surface spécifique .....	156
2.3.2. Cinétique dissolution des 3 particules .....	156
<b>Conclusion .....</b>	<b>159</b>
<b>Références.....</b>	<b>161</b>
<b>Annexes.....</b>	<b>163</b>
Résultats de la caractérisation des nano-ZnS.....	163
Calcul du recouvrement des nano-ZnS par les molécules de cystéine.....	167



## Introduction

Les résultats du chapitre précédent mettent en évidence la présence de nanoparticules de ZnS dans les PRO, plus particulièrement les digestats et les PRO bruts qui ont un taux de matière sèche faible (<16%). Dans cette partie, l'objectif est de comprendre les paramètres qui contrôlent les propriétés structurales et la réactivité des nanoparticules de sulfure de zinc (Zn). Il s'agit notamment de mieux comprendre les différences de comportement des différents ZnS qui ont été étudiés dans la littérature:

- nano-ZnS dans les PRO qui sont totalement transformés après quelques semaines de compostage (Lombi et al., 2012),
- nano-ZnS d'origine commerciale dont une fraction persiste toujours dans les sols après 2 ans (Voegelin et al., 2011),
- et sphalérite naturelle qui se dissout très lentement : moins de 1% en une année (Robson et al., 2014).

Pour expliquer cette différence de réactivité nous faisons l'hypothèse que ces particules de ZnS ont des caractéristiques intrinsèques différentes qui contrôlent leur réactivité (capacité des particules à réagir avec le milieu extérieur (dissolution, oxydation, transformations physico-chimiques)). En effet, nous avons mis en évidence la présence de nano-ZnS dans les PRO ayant une taille de cristallites d'environ 3 nm (chapitre 2). La taille fait partie des caractéristiques qui peuvent avoir une influence sur la réactivité des nano-ZnS. En effet, lorsque la taille des particules diminue, la fraction d'atomes de surface par rapport au nombre total d'atomes augmente (effet particulièrement prononcé pour des particules dont la taille est inférieure à 10nm). Ces atomes de surface ne sont pas dans leur coordinance optimale, ce qui engendre un excès d'énergie. Donc l'énergie totale du système augmente lorsque la taille des particules diminue (Banfield et Zhang, 2001). En dessous d'une certaine taille, les nanoparticules peuvent avoir des propriétés particulières qui augmentent leur réactivité (catalytiques, optiques, capacité d'adsorption...) (Auffan *et al.*, 2009). Ces propriétés proviennent en partie de modifications structurales. Dans le cas des nano-ZnS, Khalkhali *et al.* (2015) montrent par des simulations moléculaires que la structure des nano-ZnS varie en fonction de la taille. Par exemple, ils montrent que la structure de nano-ZnS d'une taille supérieure à 3nm est composée d'un cœur cristallin, entouré par un réseau désordonné d'atomes ayant un indice de coordination de 4 et d'une surface composée exclusivement d'atomes ayant seulement un indice de coordination de 3. Lorsque la taille des nano-ZnS est inférieure à 2nm, le cœur cristallin disparaît (Khalkhali *et al.*, 2015). De plus, des modifications de structure significatives ont été observées pour des nano-ZnS d'environ 3 nm par rapport au bulk telle qu'une contraction du réseau cristallin (Gilbert *et al.*, 2004). Bien que l'augmentation de la réactivité de nanoparticules puisse être liée à une contraction du réseau cristallin (c'est le cas pour des nanoparticules composées de

platine et de cuivre par exemple (Strasser *et al.*, 2010)), l'influence de ce paramètre structural sur la réactivité des ZnS n'est pas connue.

Ainsi, l'objectif de ce chapitre est de comprendre l'influence du milieu dans lequel les nano-ZnS précipitent sur leurs caractéristiques structurales. En particulier, nous nous intéressons à la taille et la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS, deux facteurs qui sont en partie liés et qui peuvent influencer sur la réactivité des nanoparticules. Cette étude a été réalisée en laboratoire sur des particules de synthèse afin d'identifier les mécanismes qui contrôlent les propriétés structurales des nanoparticules.

Différentes techniques ont été utilisées pour caractériser les dimensions des particules: microscopie électronique à transmission (MET), Diffraction des rayons X (DRX), la spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS ou Extended X-ray Absorption Fine Structure) et la diffusion totale des rayons X aux grands angles avec une analyse de la fonction PDF (Pair distribution Function). Cette dernière technique a aussi été utilisée pour déterminer la contraction du réseau cristallin. Sachant que les paramètres de taille et de contraction peuvent être corrélés (Jiang *et al.*, 2001), le premier objectif de cette partie de la thèse a été de déterminer l'influence de la taille sur les propriétés de structure (désordre structural, contraction du réseau cristallin). Puis, dans un second temps, des molécules organiques susceptibles d'être présentes dans un PRO et présentant des groupements fonctionnels distincts ont été choisies pour étudier leur influence sur la taille et la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS. Enfin, l'influence de la taille et de la contraction du réseau cristallin sur la réactivité des nano-ZnS a été étudiée en mesurant la cinétique de dissolution de ZnS en présence d'un oxydant fort,  $H_2O_2$ .

## **1. Matériel et méthodes**

Les synthèses de nano-ZnS, méthodes de caractérisation et l'expérience de dissolution sont décrites ci-après. Des détails supplémentaires sont apportés dans le chapitre 6.

### **1.1. Synthèse de nano-ZnS**

La synthèse de nano-ZnS consiste à mélanger un sel de zinc ( $ZnCl_2$ ) et un sel de soufre ( $Na_2S$ ) dans de l'eau ultrapure. La précipitation de nano-ZnS est immédiate et la suspension est soumise à une maturation à l'abri de la lumière avant une purification par centrifugation, suivie d'un lavage à l'eau ultrapure (3488g) ou dialyse (1kDa). Puis les suspensions ont été soit utilisées directement pour préparation d'une grille de microscopie, expérience de dissolution ou lyophilisées pour caractérisation par spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS: Extended X-ray Absorption Fine Structure), diffraction des rayons X (DRX) et diffusion totale aux grands angles.

Le Tableau 1 résume les paramètres expérimentaux ( $O_2$ , concentration, temps de maturation, purification, S/Zn et pH) des différentes synthèses. Des détails sont précisés dans les paragraphes correspondants qui suivent pour les nano-ZnS avec molécule organique (MO), une expérience *in situ* et une micro-ZnS (particule de sphalérite microscopique utilisée comme référence cristalline). Les paragraphes suivants justifient le choix des différents paramètres selon les séries de nano-ZnS synthétisées :

Présence d' $O_2$  : Les séries 3 et 4 ont été synthétisées en absence d'oxygène afin de préserver le groupement thiol de la cystéine et du glutathion. La série 2 a également été synthétisée en absence d'oxygène car les résultats de cette série sont comparés avec ceux des séries 3 et 4.

[ZnS] : Pour les nano-ZnS nues, la concentration en ZnS a été fixée à 0.04 M selon un protocole de la littérature (Gilbert *et al.*, 2006) et à 0.01 M pour les séries de nano-ZnS synthétisées avec molécules organiques (séries 3 et 4) suite à une optimisation du protocole pour assurer un pH identique pour chacune des synthèses en présence de molécule organique.

Temps de maturation : Le temps de maturation était de 24 à 48 heures pour les 4 premières séries synthétisées. Pour la série 5, le temps de maturation est augmenté à 5 jours afin d'obtenir une taille de particule stable pour l'expérience de dissolution des nano-ZnS. Le temps de maturation optimal, 5 jours, a été déterminé suite à une étude d'optimisation des paramètres de synthèse (résultats non présentés dans la thèse).

Purification : La purification de la série 1 a été faite par centrifugation, puis par dialyse pour les séries suivantes. Cette différence s'explique par une optimisation du protocole au cours des différentes synthèses. Les suspensions ont été dialysées contre de l'eau ultrapure renouvelée régulièrement jusqu'à ce que la conductivité soit faible ( $< 2 \mu S/cm$ ) et constante, ce qui a déterminé la durée de dialyse.

MO/Zn : le rapport molaire molécule organique/zinc a été fixé à 2 pour la série 3 pour avoir un excès de molécule organique par rapport au zinc, tel que dans un PRO. Pour la série 4, ce rapport varie afin de déterminer l'effet de la concentration sur les caractéristiques de structure des nano-ZnS.

I, S/Zn, pH : pour la synthèse de nano-ZnS nues (séries 1, 2, 5), le rapport molaire soufre/zinc varie de 0.9 à 4 afin d'obtenir des particules de différentes tailles. C'est ce paramètre qui contrôle la force ionique (I) et le pH de la suspension. Pour les séries de synthèse avec molécule organique, ce paramètre est de 1.2 pour avoir un excès de soufre par rapport au zinc, tel que dans un PRO.

Le volume des suspensions est de 50 mL pour les séries 1 à 4 afin d'obtenir une masse finale suffisante de ZnS pour la caractérisation structurale. Pour la série 5, le volume de la suspension est de 90 mL, car ces nano-ZnS ont été caractérisées et utilisées pour l'expérience de dissolution.

Tableau 1 : résumé des paramètres de synthèse des nano-ZnS

Série	Présence d'O <sub>2</sub>	[ZnS] en M	Temps de maturation	Purification	MO/Zn	I(M)	S/Zn	pH	Nomenclature
Nano-ZnS nues – Série 1	Oui	0.04	2 jours	Centrifugation	-	0.09	0.9	3.6	S/Zn 0.9
						0.08	1	3.8	S/Zn 1
						0.10	1.1	5.6	S/Zn 1.1
						0.14	1.5	12.1	S/Zn 1.5
						0.33	3	12.7	S/Zn 3
Nano-ZnS nues – Série 2	Non	0.04	2 jours	Dialyse 72h	-	0.45	4	12.9	S/Zn 4
						0.21	0.5	3.4	S/Zn 0.5
						0.10	0.9	3.6	S/Zn 0.9
						0.08	1	4	S/Zn 1
						0.09	1.1	9	S/Zn 1.1
Nano-ZnS avec molécules organiques – Série 3	Non	0.01	31 heures	Dialyse 30h	2	0.14	1.5	12.1	S/Zn 1.5
						0.20	2	12.5	S/Zn 2
						0.33	3	12.8	S/Zn 3
						0.45	4	13	S/Zn 4
						0.05	1.2	7	Nano-ZnS témoin
Nano-ZnS avec cystéine – Série 4	Non	0.01	36 heures	Dialyse 30h	0	0.03	1.2	7	Nano-ZnS-ser
									Nano-ZnS-cys
									Nano-ZnS-hist
									Nano-ZnS-acé
									Nano-ZnS-GSH
Nano-ZnS nues- série 5	Oui	0.04	5 jours	Dialyse 48h	-	-	0.9	3.5	Nano-ZnS Cys/Zn 0
									Nano-ZnS Cys/Zn
									Nano-ZnS Cys/Zn
									Nano-ZnS Cys/Zn 1
									Petite nano-ZnS
							4	12.8	Grande nano-ZnS

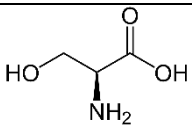
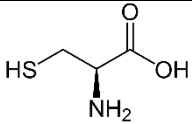
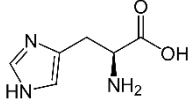
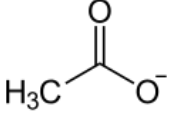
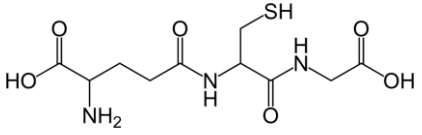
Des nano-ZnS commerciales (Sigma Aldrich) ont aussi été caractérisées pour comparaison avec les nano-ZnS synthétisées. Cet échantillon est nommé « Com. ZnS ».

### 1.1.1. Nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques (MO)

Pour les nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques, le tampon HEPES a été utilisé pour maintenir un pH égal à 7. La force ionique a été ajustée à la même valeur pour chaque synthèse. Brièvement, la solution contenant la molécule organique a été mélangée à la solution contenant  $\text{ZnCl}_2$ . Puis, la solution de  $\text{Na}_2\text{S}$  a été rajoutée au système. Le pH final était de  $7.0 \pm 0.1$ .

La série 3 comprend les molécules organiques décrites dans le Tableau 2. Pour cette série, le rapport molaire HEPES/Zn était de 7.2. Le Tableau 2 détaille la nomenclature des échantillons en fonction des molécules organiques utilisées ainsi que la structure des molécules.

Tableau 2 : Nomenclature des échantillons de nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques et la structure des molécules organiques

Nom de l'échantillon	Molécule organique	Structure
Nano-ZnS-témoin	Aucune	-
Nano-ZnS-ser	Sérine	
Nano-ZnS-cys	Cystéine	
Nano-ZnS-hist	Histidine	
Nano-ZnS-acé	Acétate	
Nano-ZnS-GSH	Glutathion	

La série 4 comprend les nano-ZnS synthétisées avec des concentrations variables en cystéine (rapport molaire Cys/Zn = 0, 0.2, 0.5 et 1). Pour cette série, le rapport molaire HEPES/Zn est de 3.45.

### 1.1.2. Expérience “in situ” : influence de la cystéine sur la contraction des particules

Pour déterminer l'effet de la présence de cystéine après formation des nano-ZnS sur leur contraction, la nano-ZnS S/Zn 0.5 de la série 2 a été caractérisée par Diffusion totale aux grands angles dans un capillaire de 3 manières différentes:

- Poudre seule,
- Poudre + eau ultrapure,
- Poudre + cystéine en solution (eau ultrapure, Cys/Zn = 0.2).

### 1.1.3. Micro-ZnS pour expérience de dissolution

La sphalérite obtenue par synthèse hydrothermale a été fournie sous forme de cristal par Elena Bazarkina (Université Grenoble Alpes, CNRS, ISTERre, UMR 5275, BP 53, 38041 Grenoble, France). Le cristal a été broyé et la fraction comprise entre 1 et 20  $\mu\text{m}$  a été conservée pour caractérisation et l'expérience de dissolution. Cet échantillon est nommé dans la suite du chapitre « micro-ZnS ».

## 1.2. Méthodes de caractérisation

Le Tableau 3 résume les méthodes de caractérisation utilisées pour chacune des séries de nanoparticules synthétisées.

Tableau 3 : Méthodes de caractérisation utilisées pour chaque série de nano-ZnS

Echantillon	EXAFS	DRX	PDF	MET	BET
Nano-ZnS nues – Série 1	x	x		x	
Nano-ZnS nues – Série 2		x	x		
Nano-ZnS avec molécules organiques – Série 3		x	x		
Nano-ZnS avec cystéine – Série 4		x	x		
Nano-ZnS nues – Série 5		x		x	X
Micro-ZnS		x			X

### 1.2.1. Microscopie électronique à transmission

Pour la préparation des grilles de microscopie électronique à transmission (MET), les suspensions de nano-ZnS ont été utilisées après la purification de l'échantillon. Les suspensions ont été diluées à une concentration en ZnS de 4 et 40 mg/L. Puis une goutte

de 7  $\mu\text{L}$ , prélevée dans la suspension placée dans un bain à ultrasons pour limiter l'agrégation des particules, a été déposée sur une grille de cuivre avec un film fin de carbone (400 Mesh).

Les images des nano-ZnS nues de la série 1 présentées ont été obtenues par observation des électrons transmis avec un microscope JEOL JEM-2010 (200 keV) au CINAM de Marseille par Olivier Grauby (Aix-Marseille Université – UMR 7325 CINAM/CNRS, campus de Luminy, 13288 Marseille, France).

Les images des nano-ZnS nues de la série 5 présentées ont été obtenues par observation des électrons transmis avec un microscope FEI OSIRIS (200 keV) par Nithavong Cam (Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, INRA, Coll France, CEREGE, Aix-en-Provence, France). Les images en mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) ont été obtenues par balayage avec un spot de 1.5 Å et en mode HAADF (High Angle Annular Dark Field).

### **1.2.2. Diffraction des rayons X et Diffusion totale des rayons X aux grands angles**

Après lyophilisation, les échantillons sous forme de poudre ont été broyés et une fraction a été introduite dans un capillaire en kapton pour la mesure de diffusion des rayons X. Les signaux ont été obtenus au synchrotron APS à Argonne (Etats Unis) sur la ligne 11-ID-B. Le signal de diffraction des rayons X (DRX) a été obtenu à une énergie de 60 keV ( $\lambda = 0.2114$  Å) et la distance entre le détecteur 2D et les échantillons était de 70 cm. Puis, le diffractogramme ( $I=f(2\theta)$ ) a été extrait à partir de l'image 2D avec le logiciel Fit2D.

Le signal de diffusion totale aux grands angles a été déterminé à une énergie de 90 keV ( $\lambda = 0.143$  Å) et une distance échantillon-détecteur de 16 cm. Le signal d'intensité a été extrait en fonction du vecteur de diffusion  $q$  avec le logiciel fit2D. La fonction de distribution de paires (PDF) a été extraite avec le logiciel PDFgetX3 sur une gamme de  $q$  de 1.4 à 24.4 Å<sup>-1</sup>.

### **1.2.3. Spectroscopie d'absorption des rayons X (EXAFS)**

La série 1 de nano-ZnS nues a été caractérisée par absorption des rayons X au seuil K du Zn (9 659 eV) à la température de l'Hélium liquide sur la ligne FAME à l'ESRF (Grenoble), avec un monochromateur Si (220) et une intensité de 90 mA. Les échantillons lyophilisés ont été broyés finement dans un mortier en agate puis dilués dans du poly vinyl pyrrolidone avant d'être pressés sous forme de pastille circulaire de diamètre 5 mm. Les spectres EXAFS ont été mesurés en transmission sur une gamme d'énergie de 9550 eV à 10 661 eV. Les temps d'acquisition et les pas de mesure sont définis sur 3 gammes d'énergie différentes et sont résumés dans le Tableau 4 :

Tableau 4 : Pas de temps et temps d'acquisition définis pour l'acquisition des spectres EXAFS

E min (eV)	E max (eV)	Pas de mesure (eV)	Temps d'acquisition (s)
9550	9642	2	2
9642	9704	0.5	2
9704	10 661	1	3

Les spectres ont été extraits et normalisés avec le logiciel Athena. Puis une analyse de type *ab-initio* a été réalisée avec le logiciel Artemis. Cette analyse consiste à créer un modèle à partir de la structure de base de la sphalérite. Le logiciel Artemis permet de faire varier les paramètres de ce modèle afin de le faire correspondre au signal expérimental. Les paramètres que l'on fait varier sont les suivants :

- La nature chimique de l'élément voisin,
- Nombre moyen d'atomes voisins du Zn (N),
- Distance entre le Zn et les atomes voisins (R),
- Facteur de désordre thermique et structural ou facteur de Debye Waller ( $\sigma^2$ ).

Ces paramètres sont définis pour chaque couche de coordination des ZnS à partir de l'atome absorbeur (zinc, Zn). Zn-S1 correspond à la première couche de coordination, Zn-S2 la deuxième, Zn-S3 la troisième.

#### 1.2.4. Détermination des paramètres de structure des nano-ZnS

La taille des nano-ZnS synthétisées a été obtenue de différentes manières.

##### 1.2.4.1. Taille MET

La taille des particules imagées par MET a été déterminée avec le logiciel Image J.

##### 1.2.4.2. Taille minimale (DRX)

La taille minimale par DRX est la taille déterminée par la formule de Sherrer qui permet de calculer la taille des cristallites, ou domaines de cohérence, à partir de la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction. Pour les nanoparticules de tailles < 5 nm, les pics de diffraction peuvent se recouvrir et le pic correspondant au plan 220 a été choisi pour déterminer la taille car il ne recouvre pas d'autre pic de diffraction. Cette taille DRX est nommée taille minimale car la présence de cristallites petites donne lieu à des pics de diffraction larges qui peuvent cacher la présence de cristallites plus grandes. L'erreur



présentée correspond à l'écart type de 3 valeurs de taille déterminées par 3 modélisations du diffractogramme différentes<sup>1</sup>.

#### 1.2.4.3. Taille maximale (PDF)

La taille maximale correspond à la fin des oscillations de la fonction PDF. La fonction PDF représente les distances interatomiques de l'échantillon sur une échelle de quelques nanomètres. Au-delà d'un certain seuil, on observe des oscillations de basse fréquence qui correspondent à un bruit de fond. La distance la plus grande pour laquelle on observe une caractéristique du signal différente des oscillations liées au bruit correspond à la taille appelée maximale. Il s'agit de la taille maximale car la fonction PDF est additive et une seule ou quelques grandes particules suffisent pour obtenir des oscillations à grande distance.

#### 1.2.4.4. Taille moyenne (PDF)

La taille moyenne est la taille obtenue par modélisation du signal PDF. Le facteur résiduel  $R$  lors de la modélisation est calculé selon la formule :

$$R_w = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w(r_i) [G_{obs}(r_i) - G_{calc}(r_i)]^2}{\sum_{i=1}^N w(r_i) G_{obs}^2(r_i)}}$$

Avec

$w(r_i)$  : un facteur multiplicatif donné à chaque point

$G_{obs}(r_i)$  : la fonction PDF expérimentale

$G_{calc}(r_i)$  : la fonction PDF modélisée

La taille moyenne est calculée en considérant l'enveloppe de la fonction PDF et la fin des oscillations qui sont deux paramètres de la fonction PDF qui sont caractéristiques de la forme et de la taille des particules. Ainsi, cette taille est considérée comme la taille moyenne des particules. Pour chaque fonction PDF, trois modélisations ont été effectuées avec des valeurs initiales de paramètres différentes. La valeur indiquée est donc la moyenne de ces trois valeurs. L'écart type est calculé à partir de ces 3 modélisations

#### 1.2.4.5. Taille EXAFS

Pour des tailles faibles (<10 nm), le nombre moyen de voisins de la 2<sup>ème</sup> couche de coordination (Zn1) varie en fonction de la taille du cluster de ZnS puisque la proportion de Zn sous-coordiné présente en surface des particules est significatif. Pour établir une relation théorique entre taille du cluster et nombre moyen d'atomes voisins, des clusters ont été créés sur le logiciel Crystal Maker à partir de la structure de la sphalérite en définissant une taille de cluster. Puis, la position (x,y,z) de l'ensemble des atomes a été

---

<sup>1</sup> Détails disponibles dans le Chapitre 6, partie 3.1.2.

extraite. La position des atomes a permis de calculer la distance  $d_{AB}$  entre chaque atome A et B :

$$d_{AB} = \sqrt{(x_B^2 - x_A^2) + (y_B^2 - y_A^2) + (z_B^2 - z_A^2)}$$

Le nombre total de distances égales à 3.825 Å, correspondant à la distance Zn-Zn1, est divisé par le nombre total d'atomes. Le résultat obtenu correspond au nombre moyen d'atomes voisins Zn1 par atome de Zn. Ce calcul permet de calculer le nombre moyen d'atomes voisins Zn1 pour plusieurs tailles de clusters créées sur Crystal Maker. Ainsi, la relation obtenue permet de déduire une taille théorique, appelée taille EXAFS, à partir du nombre moyen de voisins Zn1 obtenue après modélisation du signal EXAFS expérimental.

#### 1.2.4.6. Détermination de la contraction du réseau cristallin

La position des pics de la fonction PDF est caractéristique du paramètre de maille du cristal. Ainsi, pour modéliser le signal sur PDFgui, l'un des paramètres à faire varier est la taille de la maille cristalline (a). La contraction du réseau cristallin  $\Delta a/a$ , exprimée en %, correspond à la variation de a par rapport à la taille de la maille théorique de la sphalérite : 5.4093 Å. De même que pour la taille, la valeur de contraction du réseau cristallin indiquée est la moyenne des trois valeurs obtenues par trois modélisations différentes. L'écart type est calculé à partir de ces 3 modélisations.

#### 1.2.4.7. Analyse statistique

Le logiciel XLSTAT a été utilisé pour comparer les résultats de taille et de contraction du réseau cristallin. Le test de Kruskal-Wallis a été utilisé pour la comparaison de l'ensemble des échantillons (n=20) par rapport à un paramètre (taille ou contraction du réseau cristallin). Les trois valeurs obtenues à l'issue des trois modélisations de la fonction PDF ont été utilisées pour les comparaisons. En cas de rejet de l'hypothèse nulle de Kruskal-Wallis ( $H_0$  : les échantillons proviennent de la même population), un test post hoc a été utilisé pour des comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Conover-Iman. Les p-values obtenues ont été comparées au niveau de signification corrigé de Bonferroni ( $\alpha_B = 0.0003$ ) afin de conclure sur une différence significative entre deux échantillons.

### 1.2.5. BET

L'appareil utilisé pour la mesure de sorption est le système ASAP2020 (Micromeritics) du laboratoire ICGM à Montpellier. Les mesures et la détermination de la surface spécifique ont été faites par Bénédicte Prelot (Institut Charles Gerhardt, UMR-5253 CNRS-UM-ENSCM, Université de Montpellier, Place E. Bataillon, F-34095 Montpellier cedex 5, France). La surface spécifique BET a été déduite d'après l'adsorption d'azote à 196°C sur la surface disponible de l'échantillon et a été calculée avec la méthode Brunauer-Emmet-Teller (BET). Les échantillons ont préalablement été dégazés à 120°C pendant 16 heures sous une pression résiduelle de  $10^{-2}$  Pa.

### 1.3. Dissolution des nano-ZnS

L'objectif de cette expérience est de déterminer l'influence de la taille et de la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS sur leur cinétique de dissolution dans un milieu aqueux. Pour cela, les nano-ZnS de la série 5 ont été utilisés soit la « Petite nano-ZnS » et la « Grande nano-ZnS », ainsi que la micro-ZnS utilisée comme référence cristalline et micrométrique. Chaque particule a été dispersée à une concentration de 75 mg/L dans de l'eau ultrapure avec un pH maintenu à  $5 \pm 0,1$ , une température maintenue à  $25 \pm 0,1^\circ\text{C}$  et en présence d'un oxydant, le peroxyde d'hydrogène ( $\text{H}_2\text{O}_2$ ), ajouté au début de l'incubation à un rapport molaire  $\text{H}_2\text{O}_2/\text{Zn}$  de 11. L' $\text{H}_2\text{O}_2$  a été ajouté car lors des premières tentatives de mesure de dissolution avec uniquement l'oxygène dissous comme oxydant, la dissolution était trop lente (peu de dissolution lors des 3 premiers jours) pour être mesurée dans un temps raisonnable. Ce rapport molaire a été choisi pour que l'oxydant soit en excès par rapport aux ZnS. La suspension a été échantillonnée à différents points de cinétique et filtrée avec des tubes ultrafiltration (seuil de coupure à 3 kDa) qui retient les nano-ZnS. Le filtrat obtenu contenant le Zn sous forme dissoute a été dosé par ICP-AES. L'erreur sur la concentration était inférieure à 20% par rapport au standard de justesse. Au début et à la fin de l'expérience, la suspension a aussi été échantillonnée pour un dosage du Zn total.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Influence de la taille sur le désordre structural

#### 2.1.1. Caractérisation multi-échelle: taille des nano-ZnS

La caractérisation multi-échelle a été faite sur la série 1 de nano-ZnS synthétisées.

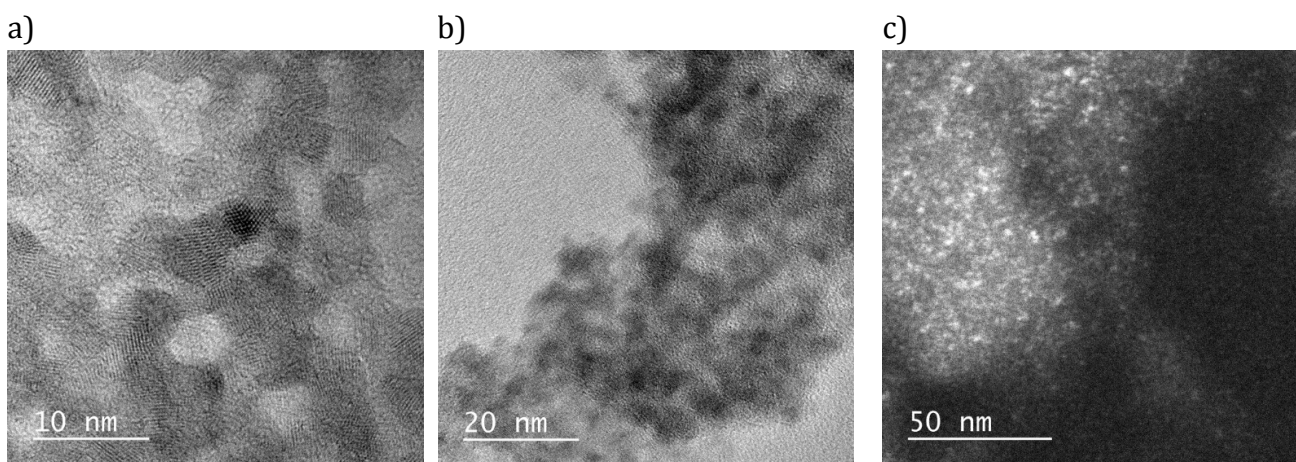


Figure 1 : Images MET des particules nano-ZnS avec les rapports molaires S/Zn (a) 4, (b) 1.1, (c) 0.9 (image en champ sombre, diaphragme de contraste) de la série 1

Les images MET de la Figure 1 montrent que les particules unitaires sont fortement agrégées. A cause de la forte agrégation des particules, il est difficile de distinguer les particules entre elles. Une taille a néanmoins été estimée pour chaque suspension de nano-ZnS (Tableau 5). Les différentes nano-ZnS ont une taille de cristallite estimée de 2.5 pour S/Zn = 0.9, de 4.7 nm pour S/Zn = 1.1 et de 5.9 nm pour S/Zn = 3. La nano-ZnS S/Zn 0.9 a été imagée en champ sombre en sélectionnant un faisceau diffractant à l'aide d'un diaphragme de contraste. Dans ces conditions, sont visualisées uniquement les cristallites en condition de diffraction (en blanc).

*Tableau 5 : tailles estimées après caractérisation par MET*

<b>Echantillon</b>	<b>Taille moyenne (nm)</b>	<b>Taille minimum (nm)</b>	<b>Taille maximum (nm)</b>	<b>Ecart type</b>	<b>Nombre de particules mesurées</b>	<b>Nombre d'images utilisées</b>
S/Zn 3	5.9	4.7	6.9	0.6	12	5
S/Zn 1.1	4.7	3.4	6.3	1.1	7	4
S/Zn 0.9	2.5	2.1	2.8	0.3	6	1

La caractérisation en DRX permet d'identifier les plans caractéristiques de la sphalérite, la phase cubique des sulfures de Zn. Les tailles des cristallites déterminées par la formule de Scherrer dans l'orientation (220) sont comprises entre 2.4 et 3.7 nm et sont présentées pour chaque particule sur la Figure 2. Comme pour les résultats de taille obtenue par microscopie, on observe que plus le rapport S/Zn est élevé, plus les cristallites sont grandes. Les diffractogrammes sont présentés en annexe du chapitre, Figure S 1. La taille des cristallites de la nano-ZnS commerciale (Com. ZnS) est de 20 nm. On peut noter que pour le rapport S/Zn de 0.9, la taille Scherrer mesurée est identique à la taille MET mesurée en champ sombre ce qui est cohérent puisque dans les deux cas, c'est une taille de cristallite qui est mesurée. En revanche, pour les rapports S/Zn de 1.1 et 3, la taille MET est supérieure à la taille des cristallites.

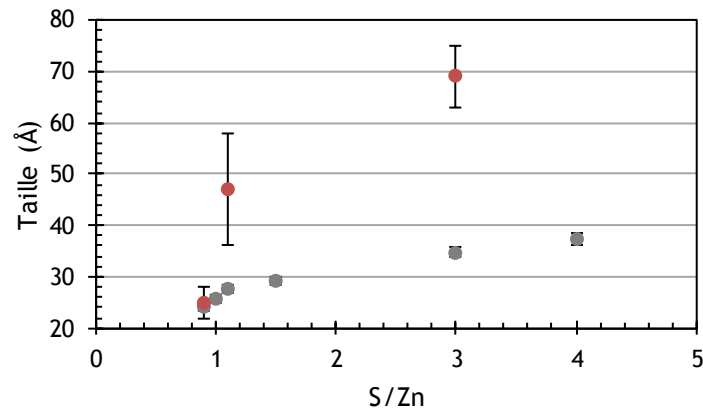


Figure 2 : Taille des cristallites déterminée par la formule de Scherrer selon l'orientation 220 (gris) et taille MET (rouge) des nano-ZnS en fonction du rapport molaire S/Zn

Une caractérisation de l'ordre local du Zn a été réalisée par spectroscopie d'absorption des rayons X. La Figure 3a. présente les signaux EXAFS au seuil K du Zn des nano-ZnS. Plus les nano-ZnS sont petites (pour les rapports S/Zn les plus petits) et moins les signaux sont structurés. Par exemple, les oscillations bien marquées entre 10 et 11.5 Å<sup>-1</sup> pour la nano-ZnS commerciale (Com. ZnS) disparaissent progressivement avec la diminution de la taille des nano-ZnS. Les résultats de la modélisation sont présentés sur la Figure 3b avec le nombre moyen d'atomes voisins de la 2<sup>ème</sup> couche de coordination, c'est-à-dire les premiers voisins Zn (Zn1). La Figure 3c présente les résultats pour le facteur Debye Waller qui représente le désordre thermique et structural des liaisons de la 2<sup>ème</sup> couche atomiques c'est-à-dire entre le Zn et son premier voisin Zn.

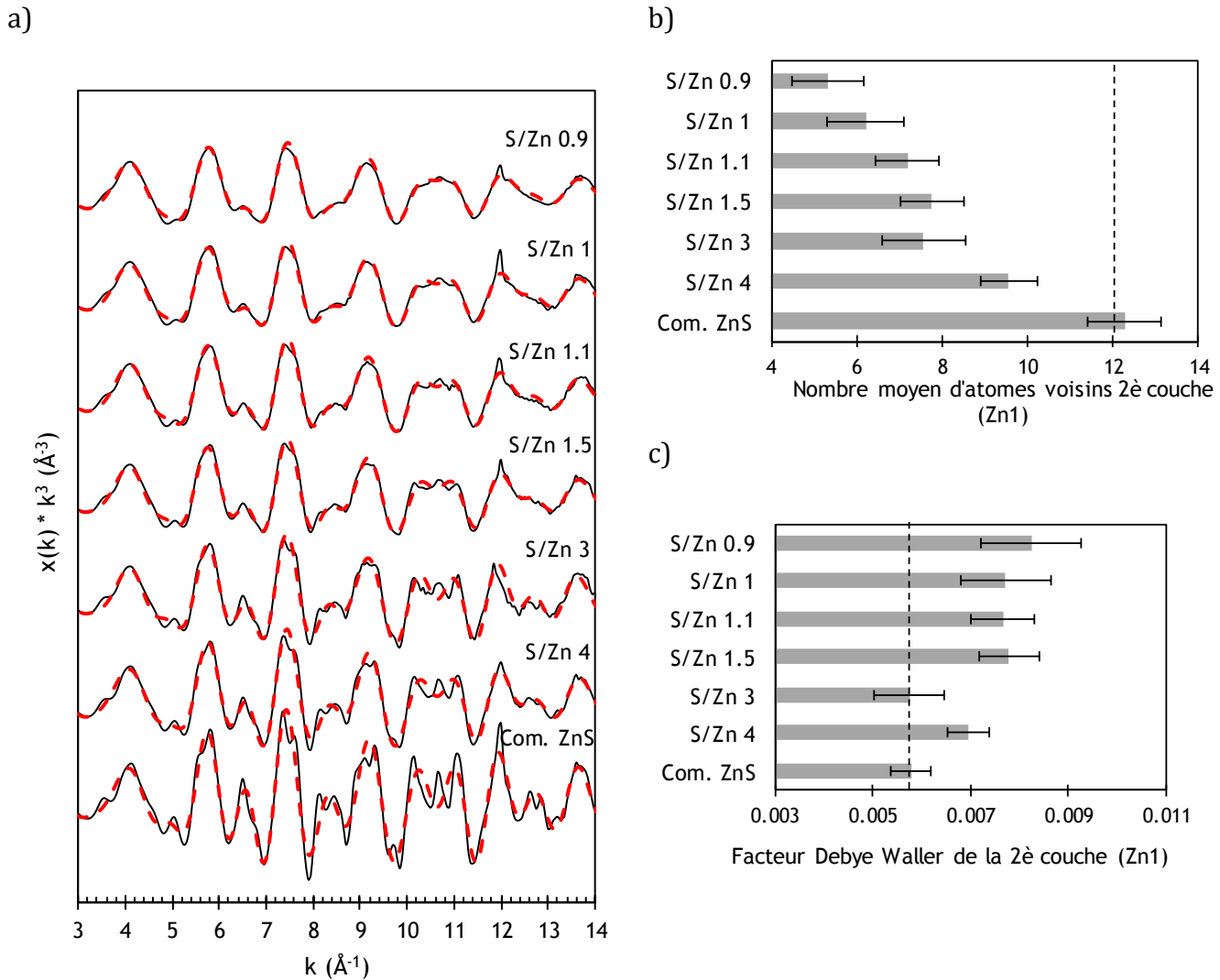
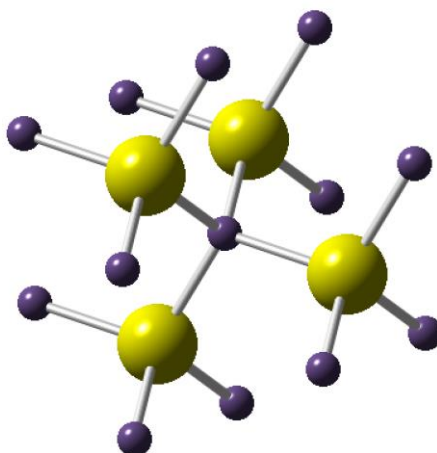


Figure 3 : Résultats de la modélisation ab-initio des signaux EXAFS des différentes nano-ZnS synthétisées et commerciale. (a) signaux EXAFS au seuil K du zinc expérimentaux (en noir) et modélisés (en rouge pointillé), (b) nombre moyen de voisins Zn1 et (c) facteur Debye Waller pour chaque échantillon.

La Com. ZnS a 12 voisins Zn1 tandis que les nano-ZnS synthétisées ont moins de voisins Zn1 (de 5.3 à 9.8). Le nombre moyen de voisins Zn1 est d'autant plus faible que le rapport S/Zn diminue c'est-à-dire que les particules sont petites. Le facteur de Debye Waller (DW) est plus élevé pour les nano-ZnS synthétisées, de taille comprise entre 2.4 et 3.7 nm, que pour la Com. ZnS de taille 20 nm. La particule nano-ZnS S/Zn 3 est une exception dans cette tendance car le facteur de DW est équivalent à celui de la nano-ZnS commerciale (0.006).

Dans la structure de la sphalérite, les atomes de Zn sont reliés à 4 atomes de soufre et les atomes de soufre sont eux même reliés à 3 autres atomes de Zn (Figure 4). Les atomes de Zn au cœur de la particule de ZnS ont donc 12 atomes voisins de Zn dans leur 2<sup>ème</sup> couche de coordination. Les atomes de Zn à la surface des particules ont moins d'atomes voisins. Ainsi, le nombre d'atomes voisins diminue lorsque la proportion d'atomes de

surface par rapport au nombre total d'atomes augmente. Cette tendance est représentée avec les points noirs sur la Figure 5 où le nombre moyen d'atomes voisins a été calculé en fonction de la taille des clusters de ZnS générés avec le logiciel Crystal Maker. Pour une valeur donnée de nombre de voisins, il s'agit de la taille correspondante pour une particule avec des atomes arrangés parfaitement selon la structure théorique de la sphalérite. Pour une taille de 200 Å, le nombre moyen d'atomes voisins calculé est de 11.7 et déterminé expérimentalement de 12. Cela signifie que la proportion d'atomes de surface est faible pour cette taille de particule.



*Figure 4 : Coordination locale du Zn dans la structure de la sphalérite avec les atomes de zinc en violet et les atomes de soufre en jaune. L'atome de Zn central est dans une configuration tétraédrique (lié à 4 atomes de S) et est entouré par 12 voisins Zn dans la deuxième sphère de coordination.*

Les points expérimentaux sont reportés en rouge sur la Figure 5 avec le nombre moyen d'atomes voisins Zn1 déterminé par la modélisation du signal EXAFS et la taille déterminée par DRX. On remarque qu'il y a un écart entre la taille DRX et la taille EXAFS particulièrement marqué pour les particules les plus petites. Par exemple, pour la taille DRX de la nano-ZnS (S/Zn 0.9), 24 Å, le nombre moyen d'atomes voisins est plus élevé en théorie (environ 9) que la valeur déterminée expérimentalement par l'EXAFS (5.4). Cet écart pourrait s'expliquer par la présence de lacunes d'atomes de Zn dans le cœur ou en surface des particules. Sur la gamme de taille synthétisée, cet écart entre les valeurs théoriques et expérimentales diminue lorsque la taille des nano-ZnS augmente. En effet, pour la nano-ZnS S/Zn 4 de taille 37 Å, le nombre moyen de voisins expérimental (9.6) est proche du nombre théorique (environ 10). Le nombre de lacunes d'atomes de Zn diminuerait alors pour des tailles de nano-ZnS croissante. Le point correspondant à la nano-ZnS (S/Zn 3) est encore hors de cette tendance observée avec un nombre de voisins plus faible qu'attendu vis-à-vis de la taille des cristallites (35 Å).

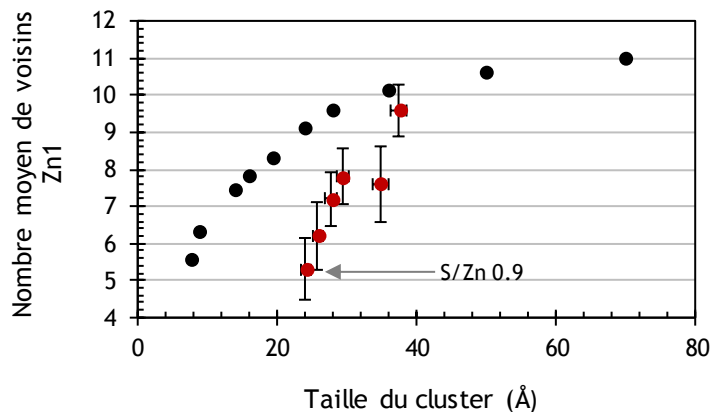


Figure 5 : Nombre moyen de voisins Zn1 théorique (en noir) et expérimental (en rouge) en fonction de la taille DRX du cluster

Cette première série de nano-ZnS synthétisées à différents rapports S/Zn a été caractérisée à différentes échelles : échelle de l'agrégat et de la particule unitaire (10 à quelques milliers d'Å) avec le MET, échelle de la cristallite (de 5 à quelques centaines d'Å) avec la DRX et à l'échelle atomique (0 à 5 Å) avec l'EXAFS. A chaque échelle, la taille des particules varie en fonction du rapport S/Zn. Selon l'échelle d'observation, il y a des différences de taille. Par exemple, la taille des particules estimée par MET est supérieure à la taille des cristallites obtenue par DRX. Il est difficile de conclure sur cette différence étant donné le peu de particules et images utilisées pour déterminer la taille MET. Premièrement, la microscopie donne une information très locale et est loin d'être représentative de l'échantillon. De plus, étant donné la difficulté à imager ces particules, la mesure de taille peut être biaisée par le fait que seule les particules les mieux définies, c'est à dire les plus grosses, ont été mesurées.

Ensuite, la taille EXAFS estimée à partir du nombre moyen de voisins Zn1 est plus faible que la taille des cristallites obtenue expérimentalement. Ceci pourrait traduire des lacunes d'atomes de Zn à l'échelle atomique, qui ne seraient pas forcément visibles à l'échelle de la cristallite. On observe aussi un désordre thermique et structural significativement plus important pour les nano-ZnS synthétisées par rapport à la Com. ZnS à l'échelle atomique. Il semble donc que les nano-ZnS < 50 Å soient significativement plus désordonnées que la Com. ZnS de 20 nm (taille DRX) qui pourrait s'expliquer en partie par la présence de lacunes. Un autre désordre structural possible est la contraction du réseau cristallin que nous avons analysée dans la partie suivante.

### 2.1.2. Relation entre taille et contraction du réseau cristallin des nano-ZnS

Dans cette partie, nous étudierons la relation entre la taille des nano-ZnS nues de la série 2 et la contraction de leur réseau cristallin. Les différentes tailles obtenues sont présentées sur la Figure 6. Comme sur la série de nano-ZnS nues présentée dans la partie



précédente, la taille diminue lorsque le rapport S/Zn diminue. Pour chaque particule, la taille est différente ( $\pm 15$  Å) selon la méthode utilisée pour la déterminer.

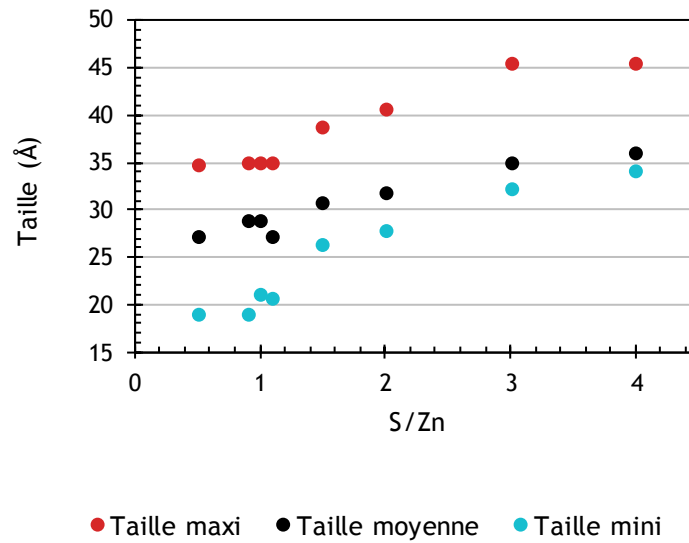


Figure 6 : Taille des nano-ZnS de la série 2 déterminée par DRX (taille mini en bleu), par modélisation de la PDF (taille moyenne en noir), par la fin des oscillations de la PDF (taille maxi en rouge) en fonction du rapport S/Zn

Pour la suite des discussions sur la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille, seule la taille obtenue par la modélisation de la fonction PDF a été utilisée car c'est celle qui est la plus représentative de l'ensemble de l'échantillon. Le test statistique montre que les différences de taille entre les nano-ZnS nues ne sont pas significatives. Cependant, nous observons une tendance selon laquelle les particules synthétisées avec un rapport S/Zn faible ont une taille plus petite.

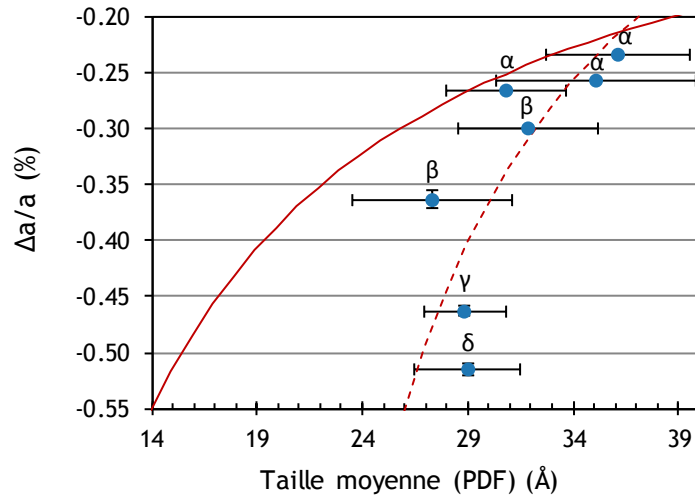


Figure 7 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des nano-ZnS. Les points bleus représentent les points expérimentaux, la courbe rouge est la courbe théorique et la courbe en rouge pointillés représente la courbe théorique décalée en x et y sur laquelle les points expérimentaux s'alignent. Les lettres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  représentent les groupes définis par la comparaison multiple des valeurs de contraction du réseau cristallin, les points qui ont des lettres différentes ont des valeurs significativement différentes.

La Figure 7 représente la contraction de la maille cristalline en fonction de la taille des particules. Une tendance générale est observable : plus les nano-ZnS sont petites, et plus la contraction est forte. Les points expérimentaux ne s'alignent pas sur la courbe théorique tracée selon l'équation décrite par Jiang *et al.* (2001) décrite dans le Chapitre 1, partie 4.1.2. ). Cependant, ils s'alignent sur cette même tendance décalée en x de 15 Å et en y de 0.15 %.

### 2.1.3. Discussion

La contraction du réseau cristallin mesurée sur les nano-ZnS est induite par la contrainte appliquée à la surface. La contrainte est une force par unité de surface qui est générée par la sous-coordination des atomes de surface et le rayon de courbure des particules. La mesure de la contraction du réseau cristallin est une manière indirecte de déterminer la contrainte à la surface des nano-ZnS.

La relation entre taille et contraction du réseau cristallin attendue a été observée. Le décalage de cette tendance par rapport aux valeurs attendues peut s'expliquer par le fait que la théorie considère des particules de ZnS isolées. Or, l'agrégation des particules de nano-ZnS de 30 Å provoque une diminution du désordre structural (Huang *et al.*, 2004). C'est pourquoi le décalage en y de +0.15%, c'est-à-dire une contrainte moins forte qu'attendue pour une taille donnée, est cohérent avec le fait que l'on observe une forte agrégation des particules synthétisées qui entraîne une diminution de l'énergie de surface et donc de la contrainte par rapport à ce que l'on pourrait attendre pour des particules isolées.

Cette tendance théorique est décrite pour les nanocristaux (Jiang *et al.*, 2001). En effet, ces auteurs démontrent à partir de l'équation de Laplace-Young<sup>1</sup> et la définition de la compressibilité<sup>2</sup> que la contrainte est liée à tension de surface<sup>3</sup> (équivalent à l'énergie de surface) des nano-ZnS et à leur taille. La tendance correspond bien aux résultats expérimentaux observés pour d'autres nano-cristaux de structure cubique face centrée, tels que la sphalérite (par exemple or, cuivre, plomb) (Jiang *et al.*, 2001). Les résultats expérimentaux présentés ici sont également cohérents avec ce qui a été observé pour des nano-CdSe : la contrainte est de -0.5% pour des nano-CdSe de 23 Å et de -0.3% pour des nano-ZnS de 37 Å (Masadeh *et al.*, 2007).

La taille minimale des nano-ZnS obtenues est de 27 Å (Figure 6 et Figure 7). Cette taille minimale est vraisemblablement contrôlée par plusieurs facteurs thermodynamiques et cinétiques. La thermodynamique permet tout d'abord de prédire la taille du noyau critique, c'est-à-dire la taille à partir de laquelle le noyau est stable et va commencer à croître. Pour des tailles inférieures à celle du noyau critique, les particules sont instables car la contribution énergétique de la surface est trop élevée (voir chapitre 1, partie 3.1. ). Ensuite après formation de ces noyaux critiques, la croissance est contrôlée par la cinétique. Le temps de maturation des nanoparticules est un paramètre important qui peut influencer sur la réactivité des nanoparticules. C'est en effet ce qui a été montré par Pham *et al.* (2014) avec des nanoparticules de HgS, ayant également une structure cubique. Dans cette étude, malgré des similitudes observées en diffraction des rayons X (même taille de cristallites), les nano-HgS ayant mûri 96 heures ont un désordre thermique et structural plus faible, à l'échelle atomique, que les nano-HgS ayant mûri 24 heures d'après la caractérisation en EXAFS au seuil L-III du Hg. Dans notre cas, nous ne savons pas si un équilibre "apparent" a été atteint après les 2 jours de maturation. La contrainte la plus forte, mesurée pour la particule la plus petite est de -0.51 % qui peut correspondre à la contrainte maximum acceptable pour la formation de nano-ZnS stables dans les conditions expérimentales de nos synthèses.

La contrainte observée pour les nano-ZnS entre 25 et 35 Å pourrait avoir une influence sur leur réactivité. Il a été démontré, par exemple, que les propriétés d'adsorption chimiques de surface de couches de palladium associé au platine ou du nickel augmentent avec la tension de surface (Bertolini, 2000), qui elle-même induit une augmentation de la contrainte (Jiang *et al.*, 2001).

---

<sup>1</sup> L'équation de Laplace-Young définit la différence de pression entre  $P_i$  à l'intérieur de la particule et  $P_e$  dans le fluide à l'extérieur de la particule en fonction de la pression de surface et de la taille des particules

<sup>2</sup> La compressibilité définit la contraction comme le rapport de la différence de tailles sur la taille initiale qui est induit par la contrainte

<sup>3</sup> La tension de surface (N/m) est le travail (N.m) de la force liée à la déformation élastique par unité de surface (m<sup>2</sup>)

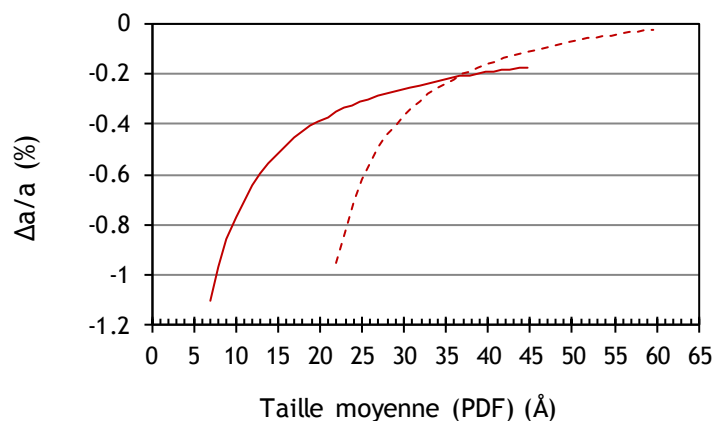


Figure 8 : courbes théorique de la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des ZnS. Rouge, trait plein : courbe théorique ; Rouge, traits discontinu : courbe théorique décalé en x et y correspondant à la tendance des nano-ZnS nues

Cette première partie démontre que la taille des nano-ZnS influence leurs propriétés structurales à différentes échelles. En comparaison avec Com. ZnS (200 Å), les nano-ZnS (24 – 37 Å) présentent un désordre thermique et structural à l'échelle atomique qui est plus important. Les particules les plus petites pourraient présenter des lacunes de Zn d'après la différence observée entre la taille EXAFS et la taille DRX. Puis, dans cet intervalle restreint de tailles de nano-ZnS synthétisées, la contrainte est plus élevée pour les particules les plus petites. Il semblerait également que la nano-ZnS la plus petite qui soit stable dans les conditions de synthèse étudiées ait une taille moyenne de 27 Å. L'objectif de la prochaine partie est de déterminer l'influence de molécules organiques sur ces 2 paramètres de structure (taille et contraction du réseau cristallin) qui peuvent contrôler la réactivité des nano-ZnS. La forte concentration en matière organique dans les PRO est en effet un élément important à prendre en compte pour notre étude.

## 2.2. Influence de la matière organique sur la structure des nano-ZnS

### 2.2.1. Influence du type de molécule organique

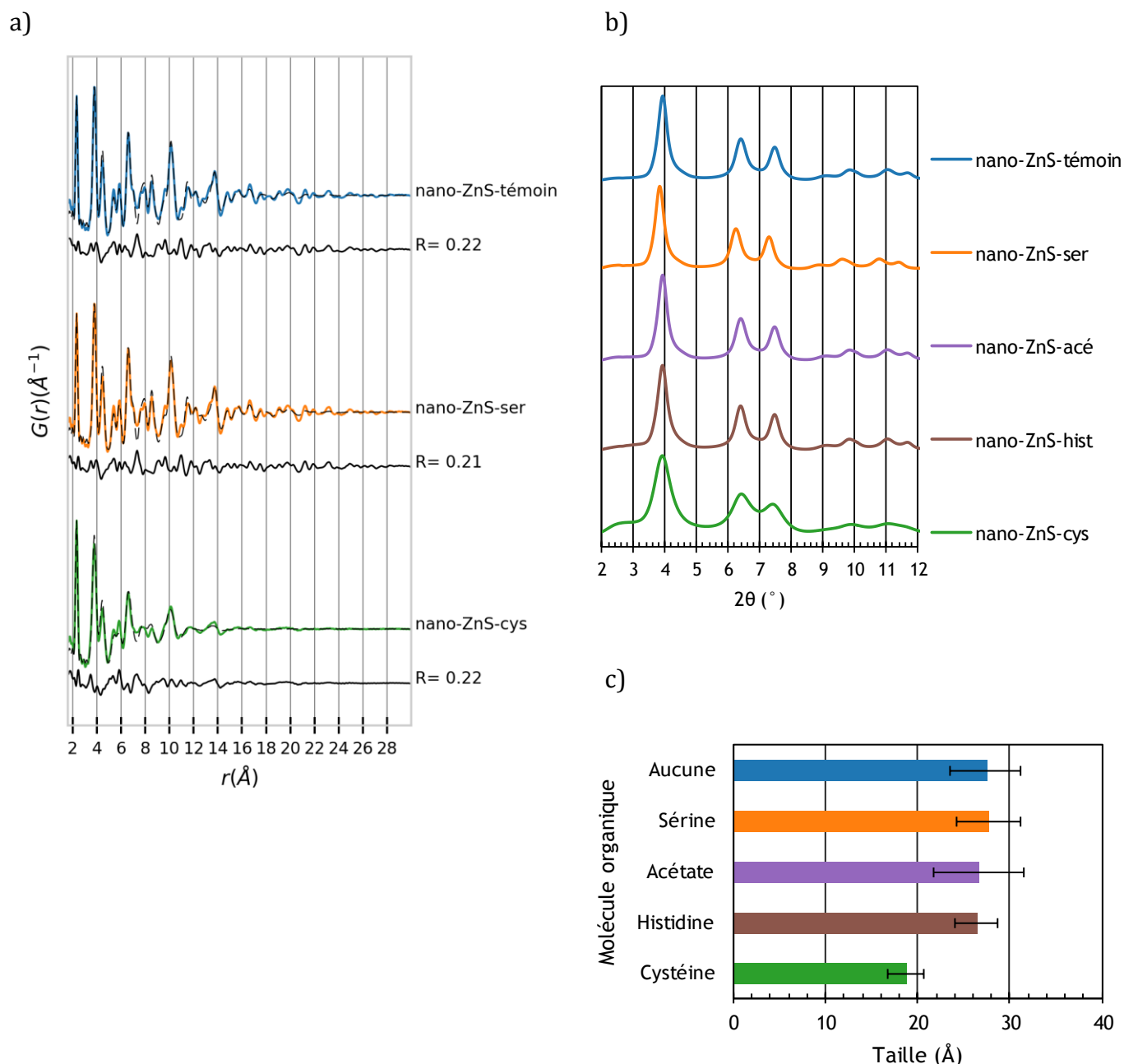


Figure 9 : a) Fonction PDF correspondant à la nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-ser et nano-ZnS-cys avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir), R est le facteur résiduel b) Diffractogrammes des nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-ser, nano-ZnS-acé, nano-ZnS-hist et nano-ZnS-cys ( $\lambda = 0.2114 \text{ \AA}$ ). c) Tailles des nano-ZnS selon la modélisation de la PDF

#### 2.2.1.1. Effet sur la taille

Les Figure 9a et b permettent de faire une première analyse qualitative de la taille des nano-ZnS formées en présence de différentes molécules organiques (sérine, acétate, histidine et cystéine). Les fonctions PDF de la nano-ZnS-témoin et des nano-ZnS-ser, nano-ZnS-acé et nano-ZnS-hist sont similaires et la fin des oscillations apparaît à la même distance (voir Figure S 3 en annexe pour les fonctions PDF de nano-ZnS-acé et nano-ZnS-hist). De même, les diffractogrammes de ces nano-ZnS sont identiques. Ces observations sont confirmées par la modélisation PDF puisque les tailles déterminées sont égales pour ces nano-ZnS-témoin et nano-ZnS-ser (27.3 et 27.6 Å, Figure 9c, les valeurs de taille sont renseignées en annexe dans le Tableau S 2). De même, d'après l'analyse statistique, il n'y a pas de différence significative observée entre ces échantillons. Nous pouvons donc en conclure que les groupements fonctionnels communs à tous les acides aminés (COOH, NH<sub>2</sub>) ainsi que les groupements hydroxyle (OH de la sérine), imidazole (spécifique de l'histidine) et CH<sub>3</sub> (composé de la structure de l'acétate) n'ont pas d'influence sur la taille finale des nano-ZnS lorsqu'ils sont présents initialement avant ajout des sulfures.

Pour la nano-ZnS-cys, les oscillations de la PDF sont visiblement moins intenses à partir de 15 Å par rapport à la PDF de la nano-ZnS-témoin (Figure 9a). De plus, les pics de diffraction sont plus larges que ceux de la nano-ZnS-témoin (Figure 9b). La taille déterminée par la modélisation de la PDF est significativement plus faible pour la nano-ZnS-cys que pour les nano-ZnS-ser et nano-ZnS-témoin ( $p < 0.0001$ ). Sachant que la seule différence entre la cystéine et la sérine est le groupement terminal (thiol (-SH) pour la cystéine et hydroxyle (-OH) pour la sérine), nous pouvons en conclure que c'est la présence du groupement thiol qui influence la taille de nano-ZnS-cys.

### 2.2.1.2. Effet sur la contraction du réseau cristallin

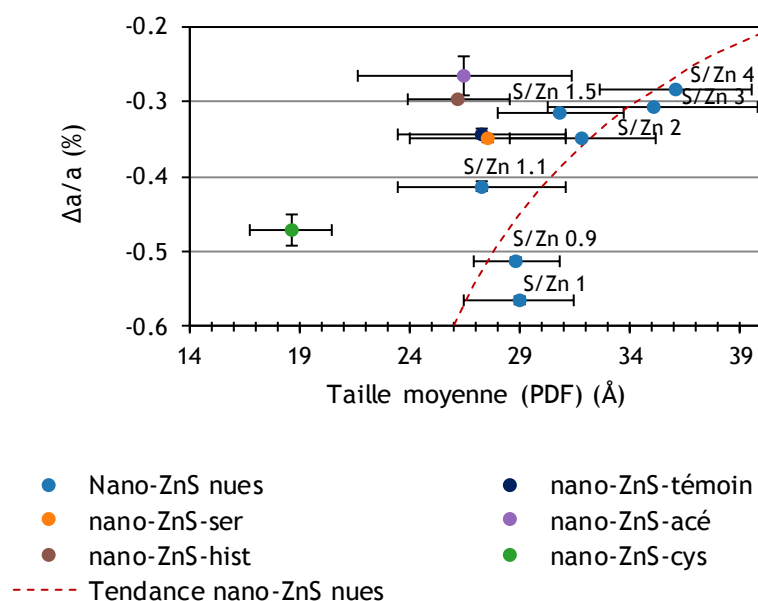


Figure 10 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille modélisée par la fonction PDF pour les nano-nues et nano-ZnS-témoin, -ser, -cys, -hist, -acé

La Figure 10 représente la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS en fonction de leur taille moyenne. Le point correspondant à la nano-ZnS-témoin est écarté de la tendance précédemment observée pour les nano-ZnS nues. En effet, la contraction du réseau cristallin de nano-ZnS-témoin est significativement moins importante que celle de la nano-ZnS S/Zn 1.1 de même taille ( $p < 0.0001$ ). Cela signifie que les conditions à l'interface solution-nano-ZnS permettent de relâcher la contrainte des nano-ZnS. La différence notable entre les deux nanoparticules est la présence d'un tampon (HEPES) pour la particule nano-ZnS-témoin. Le relâchement de la contrainte pourrait alors être dû à une faible interaction du tampon avec la surface. La contraction du réseau cristallin de la nano-ZnS-ser est équivalente à celle de la nano-ZnS-témoin. La présence de sérine n'a donc pas d'influence significative sur la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS. Le point représentant la nano-ZnS-cys est hors de la tendance décrite, la taille moyenne est significativement plus faible que la taille minimale obtenue pour les particules nues nano-ZnS S/Zn 1 et 1.1 ( $p = 0.0002$  et  $0.0001$  respectivement pour les nano-ZnS S/Zn 1 et 1.1). La taille moyenne de nano-ZnS-cys est également plus faible que celle de la nano-ZnS S/Zn 0.9, même si la différence n'est pas significative. Néanmoins, la contraction du réseau cristallin ne suit pas la tendance observée pour les nano-ZnS nues. Selon cette tendance, on aurait pu s'attendre à une contraction plus élevée que la plus petite des nanoparticules nues.

Le résultat correspondant aux nano-ZnS-acé et nano-ZnS-hist est surprenant. En effet, comme discuté précédemment, ces molécules n'ont pas eu d'effet significatif sur la taille des nano-ZnS. Nous pouvons donc supposer que l'affinité entre le Zn et les groupements fonctionnels de ces molécules n'est pas suffisante pour affecter la croissance et donc la

taille des particules. Cependant, les particules synthétisées en présence d'histidine et d'acétate ont une contraction du réseau cristallin significativement plus faible que ce que l'on pourrait observer pour des particules de même taille dans la tendance des nano-ZnS nues, par exemple nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-sérine et nano-ZnS S/Zn 1.1 ( $p < 0.0001$ ). Les groupements fonctionnels de l'acétate et de l'histidine qui sont absents sur la molécule sérine sont le groupement méthyl de l'acétate et le groupement imidazole de l'histidine. Ces deux groupements fonctionnels semblent donc avoir une légère influence sur la contrainte des nano-ZnS sans avoir d'influence sur leur taille. Le mécanisme d'interaction est donc différent de celui observé avec le groupement thiol et sera discuté dans la partie 2.2.3. Le Tableau 6 résume les principaux résultats observés dans cette première partie. Les pKa des groupements fonctionnels varient selon la molécule. Par exemple, le pKa du groupement carboxylique est différent pour la sérine et l'acétate (2.2 et 4.1, respectivement). Cependant, au pH des synthèses (pH 7), tous les groupements carboxyliques sont déprotonés. Nous faisons donc l'approximation que les propriétés de chaque groupement sont similaires pour différentes molécules.

Tableau 6 : Résumé de l'influence de chacun des groupements fonctionnels sur la taille et la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS

Groupement fonctionnel	Taille	Contraction
<b>Carboxylique</b> (sérine, acétate, histidine, cystéine)	-	-
<b>Amine</b> (sérine, acétate, histidine, cystéine)	-	-
<b>Hydroxyle</b> (sérine)	-	-
<b>Imidazole</b> (histidine)	-	x
<b>Méthyl</b> (acétate)	-	x
<b>Thiol</b> (cystéine)	x	x

L'interaction du groupement thiol avec la surface des ZnS est intéressante. Pour mieux la comprendre, l'influence de l'encombrement stérique de la molécule, l'effet de la cystéine sur le paramètre de contrainte après précipitation des nano-ZnS et l'influence de la concentration en cystéine ont été étudiés.



## 2.2.2. Interaction avec le groupement thiol

### 2.2.2.1. L'effet de l'encombrement stérique de molécule thiolée sur la taille et la contraction du réseau cristallin

Les groupements fonctionnels du glutathion (GSH) sont

- les groupements COOH et NH<sub>2</sub> qui n'ont pas d'effet ni sur la taille ni sur la contraction du réseau cristallin comme démontré avec la présence de sérine pendant la synthèse,
- un groupement thiol.

Ainsi l'interaction entre le GSH et les nano-ZnS a lieu via le groupement thiol, comme avec la molécule de cystéine. En revanche, la molécule de GSH est plus grosse que la cystéine car elle est composée de 3 acides aminés (acide glutamique, glycine, cystéine). Ainsi, la comparaison entre l'effet de la cystéine et du GSH permet de connaître l'effet de l'encombrement stérique lors d'une interaction via un groupement thiol.

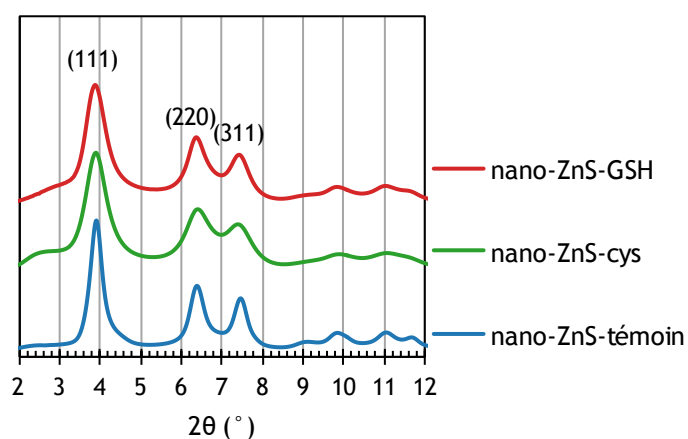


Figure 11 : Diffractogrammes des nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH -  $\lambda=0.2114 \text{ \AA}$

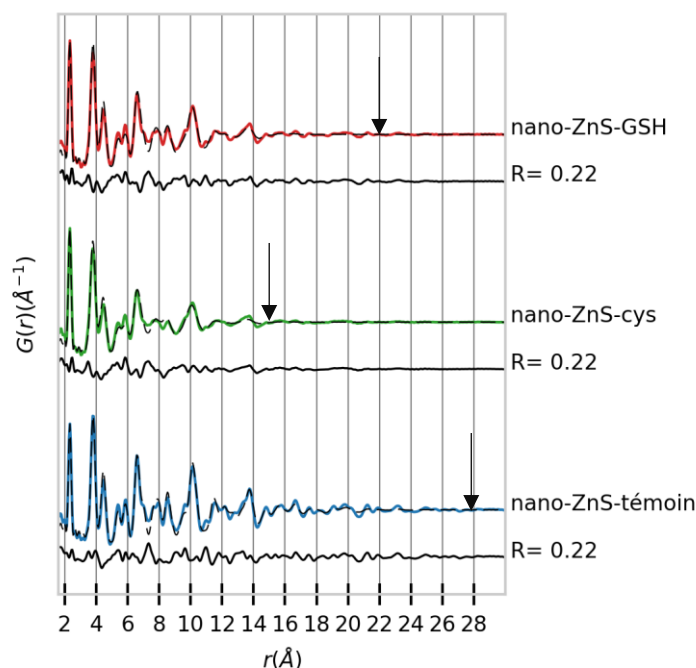


Figure 12 : Fonction PDF correspondant à la nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir). Les flèches correspondent à la fin des oscillations déterminée visuellement.

Le diffractogramme de la nano-ZnS-GSH présente des pics plus larges que la nano-ZnS-témoin (Figure 11). Le GSH a donc une influence sur la taille des cristallites des nano-ZnS. Cependant, les pics de diffraction dans la direction des plans (220) et (311) sont plus fins pour le GSH que pour la cystéine, ce qui signifie que les cristallites sont plus grandes selon ces orientations pour la nano-ZnS-GSH que pour la nano-ZnS-cys. Au contraire, le pic de diffraction correspondant au plan (111) a la même largeur pour les deux nano-ZnS synthétisées en présence d'une molécule thiol. Sur la fonction PDF, les oscillations semblent mieux définies pour la nano-ZnS-GSH que pour la nano-ZnS-cys, par exemple entre 8 et 10 Å (Figure 12). De plus, on observe une fin des oscillations vers 22 Å pour la nano-ZnS-GSH et vers 15 Å pour la nano-ZnS-cys.

Les tailles obtenues par modélisation et calculs confirment ces observations (Tableau 7). Les tailles des cristallites orientées selon le plan (111) sont identiques pour les deux particules tandis que les cristallites de nano-ZnS-GSH ont une taille supérieure (17.5 Å) à celles de nano-ZnS-cys (15.2 Å) selon le plan (220). Cette tendance est confirmée par la taille PDF malgré l'erreur qui ne permet pas de la valider avec cette méthode de détermination de la taille. Il y a donc une influence de l'encombrement stérique d'une molécule avec un groupement thiol sur la taille des nano-ZnS.

Tableau 7 : Tailles DRX et PDF pour les nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH. Les valeurs +/- correspondent à l'écart type entre 3 valeurs

	Taille des cristallites (111) en Å	Taille des cristallites (220) en Å	Taille modélisation PDF en Å
Nano-ZnS-cys	18.8 +/- 0.6	15.2 +/- 0.5	18.6 +/- 1.9
Nano-ZnS-GSH	19.4 +/- 0.6	17.5 +/- 0.5	20.7 +/- 2.3

Le point représentant la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille pour la nano-ZnS-GSH est également hors de la tendance observée pour les nano-ZnS nues (Figure 13).

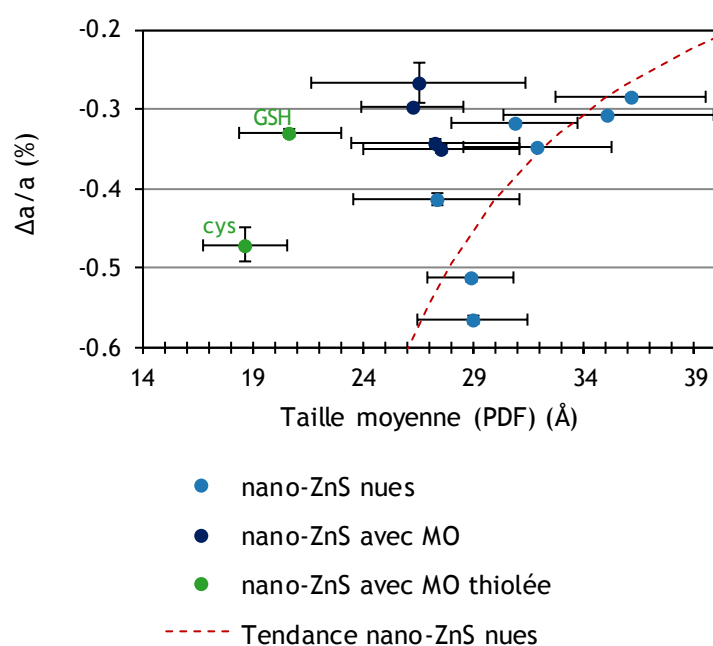
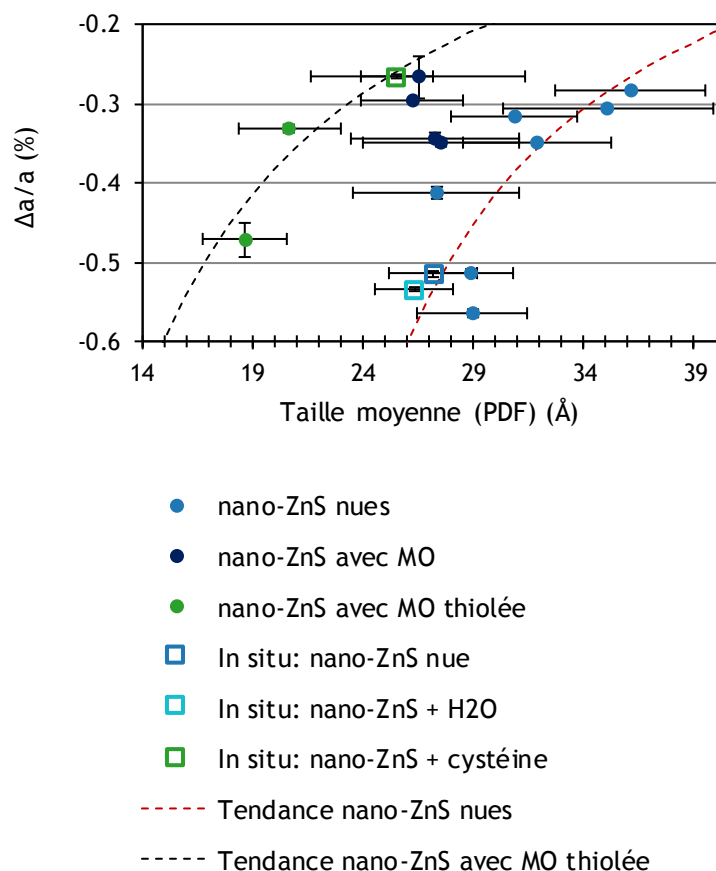


Figure 13 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des nano-ZnS nues, nano-ZnS avec MO et nano-ZnS avec MO thiolée.



un effet immédiat sur la contrainte. En effet, la valeur de contraction du réseau cristallin après ajout de cystéine est de -0.22 %, ce qui est significativement différent de la valeur avant ajout de cystéine -0.46% ( $p < 0.0001$ ). Ce résultat démontre que pour une même taille de nano-ZnS, la présence de cystéine relâche significativement la contrainte. Le point correspondant à la nano-ZnS après ajout de cystéine s'aligne avec les autres points des nano-ZnS avec MO thiolée (nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH) sur une deuxième tendance : il s'agit de la tendance des nano-ZnS nues décalées en x de - 11 Å.

#### 2.2.2.3. Effet de la concentration en cystéine sur la taille et la contraction du réseau cristallin

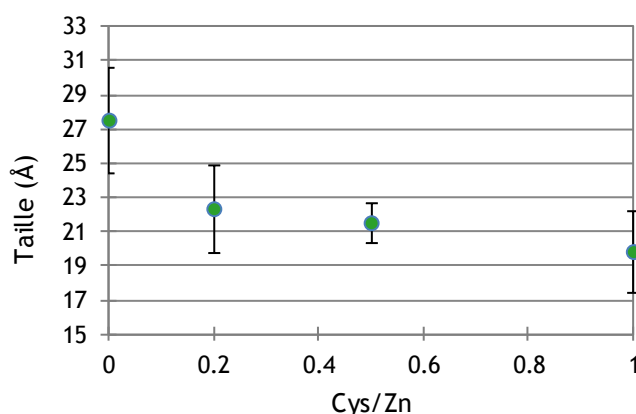


Figure 15 : Taille des nano-ZnS en fonction du rapport molaire Cystéine/Zn

La Figure 15 présente la taille des nano-ZnS selon le rapport molaire Cystéine/Zn. Un rapport de Cys/Zn de 0.2 diminue la taille des nano-ZnS (22.4 Å) par rapport à la taille de nano-ZnS témoin (27.5 Å). Les différences de tailles ne sont pas significatives mais nous pouvons discuter d'après la tendance observée. La Figure 16 présente la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille pour les conditions déjà présentées et pour les nano-ZnS avec le rapport Cys/Zn variable. Le point correspondant à la nano-ZnS Cys/Zn 0 est proche de la tendance des nano-ZnS nues. Plus le rapport Cys/Zn augmente et plus les points correspondant se rapprochent du point correspondant à la nano-ZnS-cys qui a un rapport Cys/Zn de 2. La contraction du réseau cristallin est significativement plus forte pour les nano-ZnS Cys/Zn 0.2 et 1 que pour la nano-ZnS Cys/Zn 0 ( $p < 0.0001$ ). Les nano-ZnS 0.2 et 1 sont plus petites donc ce résultat est cohérent avec la relation taille et contraction montrée dans la partie 2.1.2. ). Les 3 points correspondant aux nano-ZnS synthétisées avec des rapports Cys/Zn compris entre 0.2 et 1 sont compris entre les deux tendances précédemment observées.

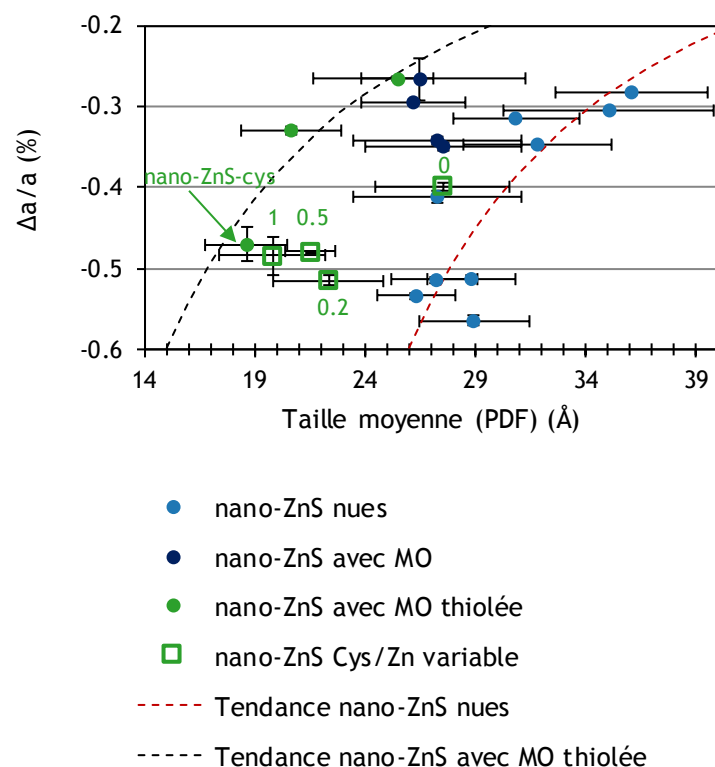


Figure 16 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille de l'ensemble des nano-ZnS des séries 2, 3 et 4.

Dans la série de nano-ZnS avec molécules organiques (série 3), le rapport Cys/Zn était de 2. Selon un calcul théorique considérant les nano-ZnS et les molécules de cystéine avec un encombrement sphérique (détaillé en annexe, page 167), le rapport molaire Cystéine/Zn nécessaire pour couvrir toute la surface des nano-ZnS serait de 0.61 pour des nano-ZnS de 18.6 Å. Ce calcul considère un recouvrement maximal des molécules de cystéine formant une monocouche à la surface des nano-ZnS en négligeant d'éventuelles forces de répulsion entre les molécules de cystéine. Les résultats du calcul de recouvrement en fonction de la taille des nano-ZnS obtenues sont présentés dans le Tableau 8.

Tableau 8 : Résultats des calculs de recouvrement de la surface des nano-ZnS par les molécules de cystéine

Nom	Taille de nano-ZnS obtenue (Å)	Cys/Zn pour un recouvrement total	Surface recouverte avec rapport Cys/Zn de la synthèse
Cys/Zn 0	27.5	0.35	0 %
Cys/Zn 0.2	22.4	0.46	43 %
Cys/Zn 0.5	21.5	0.49	98 %
Cys/Zn 1	19.9	0.55	100 %
Nano-ZnS-cys (Cys/Zn=2)	18.6	0.61	100 %

Ainsi, pour Nano-ZnS-cys (Cys/Zn=2), la surface des nano-ZnS était probablement totalement recouverte de molécules de cystéine, ce qui explique que la croissance cristalline ait été inhibée. Le recouvrement partiel des nano-ZnS à un rapport Cys/Zn de 0.2 pourrait expliquer que la taille et la contraction du réseau cristallin moyennes soient plus élevées que pour les rapports Cys/Zn plus élevés (bien que la différence ne soit pas significative).

### 2.2.3. Discussion

#### 2.2.3.1. Influence du groupement thiol sur la taille des nano-ZnS

L'influence des molécules composées d'un groupement thiol (cystéine, GSH) sur la taille peuvent être expliqués par une liaison covalente entre les atomes de Zn sous-coordonnés à la surface des NPs et leur groupement thiol, ce qui participe à bloquer la croissance des nano-ZnS à un certain stade. Une étude récente de dynamique moléculaire a montré que parmi 20 acides aminés, la cystéine est celui qui a une énergie de liaison la plus importante sur une surface de ZnS (110). L'énergie de liaison jusqu'à 10 fois supérieure à celle des autres acides aminés s'explique par la formation d'une liaison disulfure entre l'atome de soufre de la cystéine et les soufre en surface des ZnS illustrée sur la Figure 17 ou bien une coordination directe du Zn de surface (Nawrocki et Cieplak, 2014).

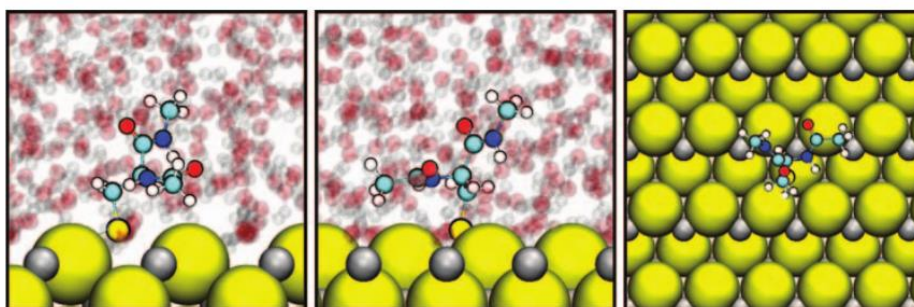


Figure 17 : conformation de la cystéine à la surface de ZnS (atomes de soufre en jaune et atomes de zinc en gris). Image issue de Nawrocki et Cieplak (2014)

La liaison des atomes de Zn ou de soufre sous-coordonnés à la surface des NP avec les groupements thiols **diminue l'énergie de surface des nano-ZnS**. En effet, l'énergie de surface dépend principalement des atomes dont la valence est insatisfaite. Cela a une influence sur le rayon du noyau critique. La taille du noyau critique correspond au maximum de la variation d'enthalpie libre totale ( $\Delta G$ ) qui est la somme des termes correspondant au bulk ( $-\Delta G_B$ ) et à la surface ( $\Delta G_S$ ):

$$\Delta G = -\Delta G_{bulk} + \Delta G_S$$

$$\Delta G = \frac{-4\pi}{3} r^3 \Delta g + 4\pi r^2 \sigma$$

Avec

$\Delta g$  la variation d'enthalpie libre par unité de volume

$\sigma$  l'énergie de surface

L'effet de l'adsorption de molécules en surface sur l'énergie de surface et sur le rayon du noyau critique est illustré ci-dessous sur la Figure 18 (courbe en rouge).

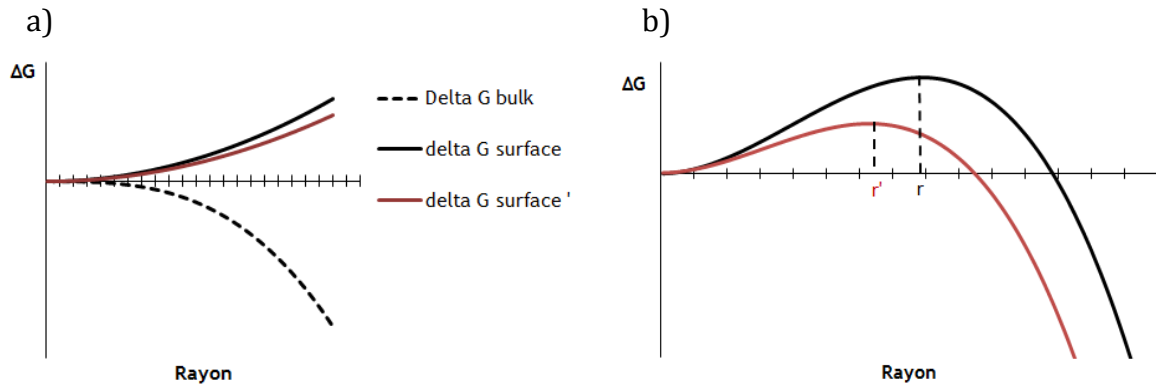


Figure 18 : a) variation d'enthalpie libre correspondant au bulk ( $-\Delta G_B$  en pointillés) et à la surface ( $\Delta G_S$  en noir et  $\Delta G_S'$  en rouge) en considérant les énergies libres  $\sigma$  et  $\sigma'$  avec  $\sigma' < \sigma$ . b) Somme des deux termes  $\Delta G$  (noir) et  $\Delta G'$  (rouge) considérant  $\sigma$  et  $\sigma'$  et représentation du rayon du noyau critique  $r$ .

Ainsi, lorsque l'enthalpie libre de surface diminue ( $\Delta G_{\text{surface}}'$ ) suite à l'adsorption de ligands à la surface tels que des groupements thiols, le système est thermodynamiquement favorable à la formation de particules plus petites ( $r'$ ).

Le glutathion étant une molécule avec un poids moléculaire plus élevé que la cystéine (x 2,5 en comparaison avec la cystéine), moins de molécules par unité de surface peuvent se fixer à la surface des nano-ZnS à cause de l'encombrement stérique. Un effet direct est le décalage du rayon critique vers des distances plus élevées ce qui explique que les particules de nano-ZnS-GSH soient plus grandes que les nano-ZnS-cys (voir Figure 19). Ceci est cohérent avec les différences de taille observées pour les domaines de cohérences dans le plan 220 ainsi que les différences qualitatives observées entre les diffractogrammes et PDF des nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH.



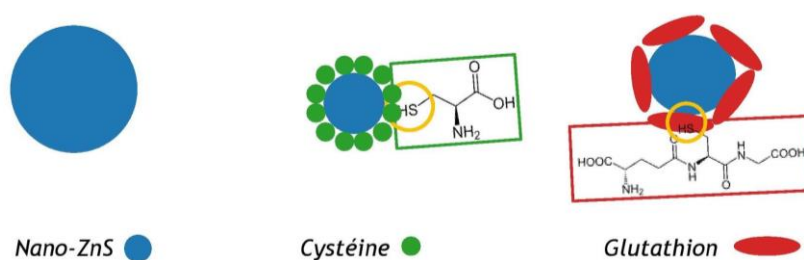


Figure 19 : Représentation du recouvrement de la surface des nano-ZnS par la cystéine et le glutathion.

En revanche, la largeur du pic de diffraction est identique pour le plan (111) pour les nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH, contrairement aux autres pics de diffractions (plans (220) et (311)) qui sont plus fins pour la nano-ZnS-GSH (cristallites plus grandes selon ces 2 orientations). La taille des cristallites n'est donc pas affectée de la même manière selon le plan cristallin. Comme discuté précédemment, avec l'encombrement stérique du GSH, moins de groupements thiols se fixent par unité de surface des nano-ZnS qu'avec la cystéine. Il semble donc que les groupements thiols du GSH se fixent préférentiellement à la face (111) dont les cristallites sont plus affectées que sur les autres faces. Cette face est celle qui a le plus d'affinité pour les molécules thiolées. En effet, la face (111) est une face polaire qui permet aux nano-ZnS d'interagir avec les molécules environnantes via des liaisons électrostatiques plus fortes qu'avec des faces non polaires telles que la face 220 (Barnard *et al.*, 2010). Xu *et al.* (2016) avaient déjà remarqué la présence de défauts de structure (défauts d'empilement, macles) seulement sur la face (111) de nano-ZnS biogéniques.

L'influence de la cystéine sur la taille des nano-ZnS est significative dès un rapport Cys/Zn de 0.2. D'après le calcul théorique, cette quantité de cystéine n'est pas suffisante pour recouvrir entièrement la surface des nano-ZnS. Nous pouvons en conclure qu'il n'est pas nécessaire de recouvrir toute la surface pour bloquer la croissance des nano-ZnS. Les groupements thiols se fixent donc préférentiellement sur des sites spécifiques de croissance tels que les nœuds et marches (sites de croissance décrits dans le chapitre 1, partie 3.1. ). L'adsorption des groupements thiols à ces sites spécifiques diminue suffisamment l'énergie de surface pour limiter la croissance et empêcher l'intégration de nouvelles unités de croissance à ces sites spécifiques.

D'après la littérature, les nano-ZnS biogéniques, synthétisées en présence de bactéries sulfato-réductrices, ont tendance à être plus grandes que les nano-ZnS abiotiques (Peltier *et al.*, 2011; Xu *et al.*, 2016). Xu *et al.* (2016) avancent l'hypothèse de la stabilisation des faces polaires (111) par interaction avec les cellules ou métabolites bactériens, qui aurait pour effet de favoriser la croissance cristalline. Les résultats présentés ici montrent que les molécules organiques telles que l'acétate, l'histidine, la sérine n'ont pas d'influence sur la taille des nano-ZnS et que les molécules composés d'un groupement thiol, au

contraire diminuent la taille des nano-ZnS. De plus, lorsque la surface n'est pas totalement recouverte, l'interaction avec les groupements thiol est plus importante sur la face (111), ce qui diminue d'avantage la taille des cristallites dans ce plan que dans les autres plans. Ainsi, l'influence des microorganismes sur la taille des nano-ZnS pourrait être due à un autre mécanisme, comme par exemple une disponibilité du soufre réduit ( $S^{2-}$ ) plus progressive. Le taux de sursaturation serait donc plus faible, ce qui favorise la croissance des noyaux déjà formés plutôt que la formation de plusieurs noyaux plus petits.

Les résultats présentés ici ne sont pas cohérents avec ceux de Gondikas *et al.* (2012) mais les conditions expérimentales sont également très différentes (cinétique, nature du tampon, pH). Dans cet article, 1 h après la formation des nano-ZnS, les nano-ZnS avec un rapport Cys/Zn de 2 sont plus grandes que les nano-ZnS témoins et plus petites que les nano-ZnS témoins avec un rapport Cys/Zn de 1, d'après les résultats de modélisation *ab-initio* du signal EXAFS au seuil K du Zn. Puis, 13h après leur formation, la taille des nano-ZnS augmente avec la quantité de cystéine d'après une caractérisation par diffusion des RX aux petits angles. En conclusion, cette étude montre que la cystéine favorise la croissance des nano-ZnS, ce qui est contraire aux résultats présentés ici. Un premier paramètre qui pourrait expliquer la différence entre cette étude et l'étude de Gondikas *et al.* (2012) pourrait être le temps de maturation des nano-ZnS. En effet, cette même étude montre que les nano-ZnS s'agrègent en présence de cystéine seulement à partir de 13 heures (Gondikas *et al.*, 2012). Notre étude s'intéresse à la structure des nano-ZnS après un temps de stabilisation de 30 heures minimum. La présence de carbonates (en excès par rapport au Zn) utilisés pour tamponner le pH autour de 8.1, dans l'étude de Gondikas *et al.* (2012) peut également avoir un effet sur la croissance des particules étant donné la forte affinité de ces derniers pour le Zn, ce qui change les conditions thermodynamiques du système.

#### 2.2.3.2. Influence des différentes molécules organiques sur la contraction du réseau cristallin

Sur la figure représentant la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille, les points correspondant aux nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH sont hors de la tendance observée pour les nano-ZnS nues (Figure 16). Cela pourrait s'expliquer par le fait que les groupements thiols n'affectent pas seulement la taille des particules mais aussi la contrainte. Ceci est bien illustré par les mesures de contraction du réseau cristallin sur le même échantillon avant et après réaction avec la cystéine (taille de particule constante, Tableau S 3 en annexe). La diminution de contraction du réseau cristallin après ajout de cystéine illustre la baisse d'énergie de surface (Jiang *et al.*, 2001) causée par la liaison forte entre le Zn et/ou le soufre en surface et les groupements thiols. La cystéine a donc pour effet de diminuer la taille des particules mais aussi relâcher la contrainte.

Nous nous attendions également à observer une diminution de la contrainte après ajout d'eau. L'ajout d'eau a eu un effet minime sur la contraction du réseau cristallin et n'a eu aucun effet sur la taille. Zhang *et al.* (2003) ont montré que la liaison avec l'eau

provoque un réarrangement des atomes à la surface des nano-ZnS vers une structure plus ordonnée. La différence avec notre étude est que les nano-ZnS ont été synthétisées dans du méthanol dans l'étude de Zhang *et al.* (2003). Les nano-ZnS dans notre étude ont été synthétisées dans de l'eau puis lyophilisées. La lyophilisation ne permet pas d'éliminer 100% des molécules d'eau. Ainsi, les liaisons avec les molécules d'eau restantes à la surface des nano-ZnS pourraient suffire à réordonner la structure atomique des nano-ZnS et donc relâcher la contrainte. L'ajout supplémentaire d'eau n'a donc pas d'influence sur la contrainte

Plusieurs points identifiés hors de la tendance des nano-ZnS nues (nano-ZnS-cys, nano-ZnS-GSH, nano-ZnS après ajout de cystéine, nano-ZnS-acé et nano-ZnS-hist) s'alignent sur une seconde tendance décalée en x de celle des nano-ZnS nues de l'ordre - 11 Å. Bien que l'interaction avec l'acétate et l'histidine n'ait pas eu d'influence sur la taille des nano-ZnS, cette interaction relâche la contrainte des nano-ZnS. En effet, pour des particules nues de même taille, la contraction du réseau cristallin est plus forte. Sachant que la sérine et donc les groupements carboxyliques (-COOH) et amines (-NH<sub>2</sub>) n'ont pas d'influence sur la contrainte, l'interaction avec l'acétate et l'histidine se ferait donc avec les groupements méthyl (-CH<sub>3</sub>) et imidazole respectivement. L'hypothèse qui est faite est que l'interaction entre l'acétate, l'histidine et la surface des particules n'est pas suffisamment forte pour avoir un effet significatif sur la taille des particules mais suffisamment forte pour relâcher la contrainte. Cette hypothèse est en cohérence avec une étude théorique qui montre que l'énergie de liaison entre l'histidine et la surface de ZnS est relativement faible (3.06 kJ/mol lorsque l'atome de Nδ est protoné et Nε déprotoné) mais légèrement plus importante que celle de la sérine (1.95 kJ/mol). L'adsorption de l'histidine à la surface de ZnS est causée par la substitution de l'oxygène de molécules d'eau qui interagissent directement avec la surface de ZnS. Cette substitution se fait via l'atome Nε qui est déprotoné (Nawrocki et Cieplak, 2014). Il a été montré que le groupement méthyl est une extrémité hydrophobe de l'acétate qui initie l'interaction de molécules sur une surface composée d'atomes d'or (Hoeftling *et al.*, 2010). Sachant que la surface ZnS est principalement hydrophobe (Nawrocki et Cieplak, 2014), ce mécanisme pourrait expliquer l'interaction de l'acétate avec la surface des nano-ZnS.

La deuxième tendance observée sur la relation entre la contraction du réseau cristallin et la taille des ZnS montre que l'interaction avec certains groupements fonctionnels modifie l'équilibre thermodynamique. En effet, en présence de certaines molécules organiques, des nano-ZnS plus petites que celles formées sans molécules organiques. En effet, l'interaction de surface diminue l'énergie de surface et diminue la taille minimale observée sur la tendance des nano-ZnS nues de 11 Å.

Ainsi, nous avons identifié des groupements fonctionnels qui relâchent la contrainte à la surface des nano-ZnS: thiol, méthyl et imidazole. Le groupement thiol qui a une énergie de liaison plus forte a également la particularité d'inhiber plus fortement la croissance des particules et cette inhibition dépend aussi de l'encombrement stérique de la molécule. Les groupements méthyl et imidazole n'influencent pas la taille mais

l'interaction de ces groupements fonctionnels avec la surface des nano-ZnS permet de relâcher la contrainte. La matrice organique des PRO dans laquelle les nano-ZnS sont formées est composée de nombreuses molécules avec ces groupements fonctionnels qui peuvent donc influencer la structure des nano-ZnS. Ces paramètres de structure (taille, contrainte) peuvent avoir un effet sur la réactivité. L'objectif de la prochaine partie est donc de déterminer la cinétique de dissolution de nano-ZnS de différentes tailles et donc avec des contraintes de surface différentes.

## 2.3. Influence de la taille et de la contrainte sur la cinétique de dissolution des nano-ZnS

Les 3 particules utilisées, la « petite nano-ZnS » (rapport S/Zn 0.9), la « grande nano-ZnS » (rapport S/Zn 4) et la micro-ZnS, ont été caractérisées par MET, DRX, et par BET.

### 2.3.1. Caractérisation des 3 particules

#### 2.3.1.1. MET

Les deux nanoparticules synthétisées ont été caractérisées par MET afin d'obtenir une distribution de taille et une caractérisation de leur morphologie. La Figure 20 présente les 2 nano-ZnS qui seront utilisées pour la mesure de la cinétique de dissolution. Ces particules sont fortement agrégées dans les deux cas et ont une forme ovoïdale.

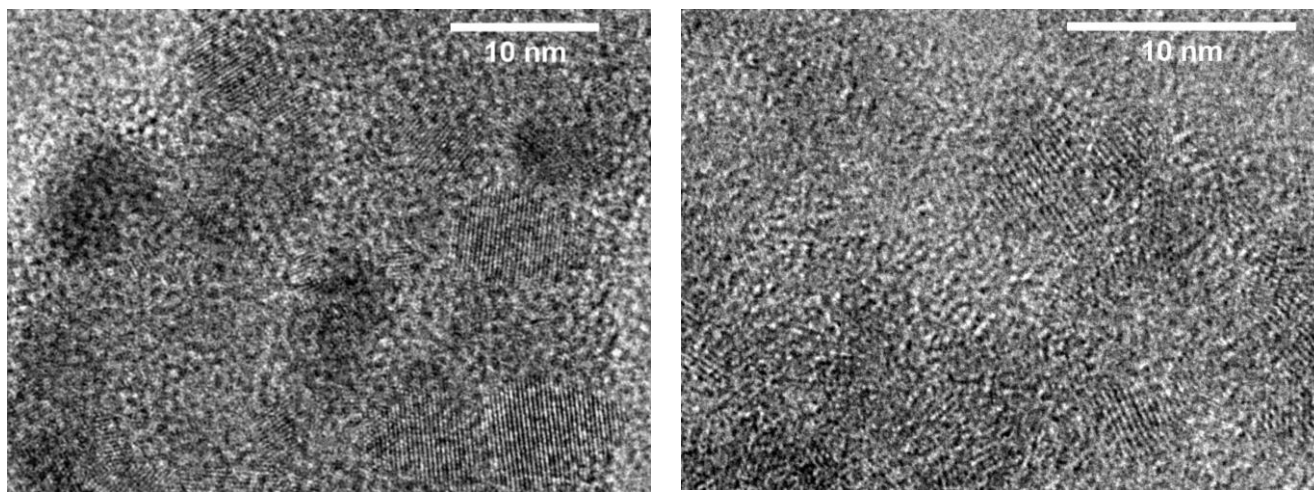


Figure 20 : Images de microscopie électronique à transmission pour la « Grande nano-ZnS » à gauche et la « Petite nano-ZnS » à droite.

Une analyse de la taille des cristallites observées a permis d'obtenir une taille moyenne de  $7.2 \pm 1.8$  nm pour la grande nano-ZnS et de  $4.2 \pm 0.8$  nm pour la petite nano-ZnS. Les tailles de particules déterminées par MET sont donc différentes.

Tableau 9 : Détermination de la taille des nano-ZnS de la série 5 d'après les images MET

Echantillon	Taille moyenne (nm)	Taille minimum (nm)	Taille maximum (nm)	Ecart type	Nombre de particules mesurées	Nombre d'images utilisées
Grande nano-ZnS	7.2	3.6	11.3	1.8	58	13
Petite nano-ZnS	4.2	3.1	6.7	0.8	24	8

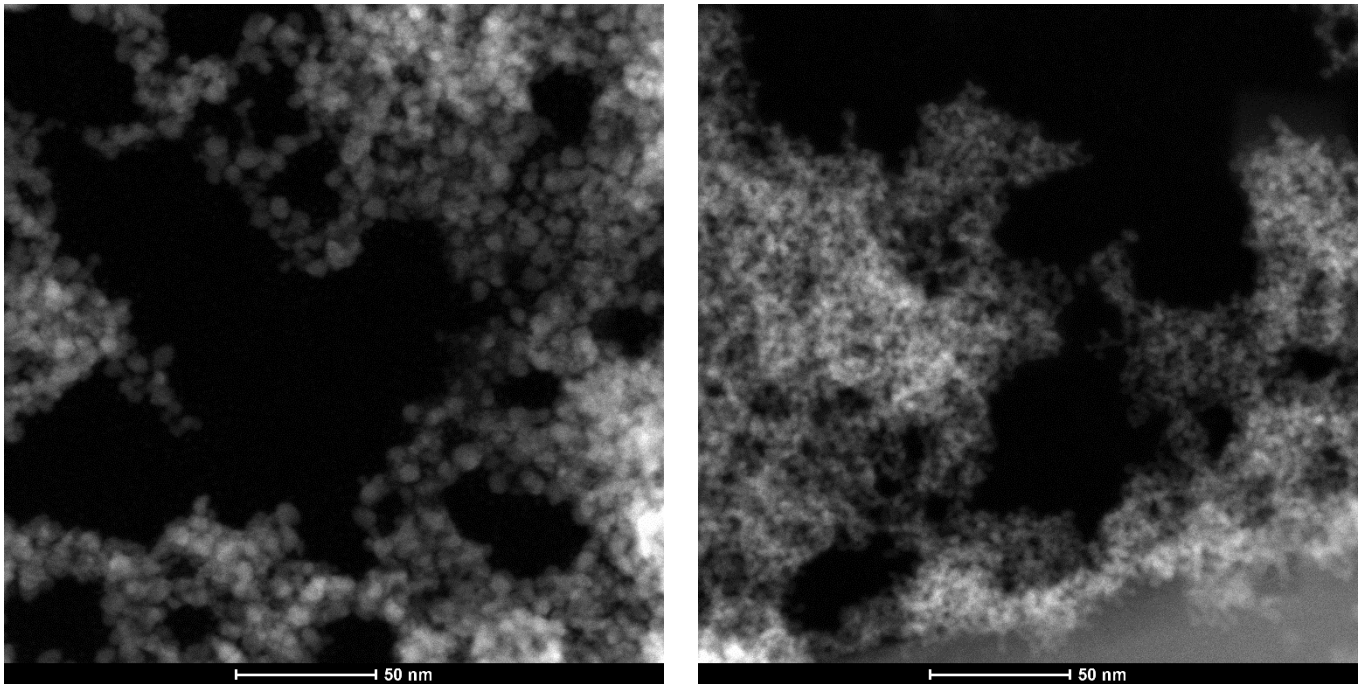


Figure 21 : Images de microscopie en mode STEM – HAADF pour la « Grande nano-ZnS » à gauche et la « Petite nano-ZnS » à droite.

La Figure 21 présente les deux nano-ZnS imagées en mode STEM – HAADF, le contraste permet de mieux distinguer les particules unitaires et d'observer leur morphologie. Comme observé sur les images de MET, les particules ont une forme ovale à ronde. Ce mode d'imagerie permet également de bien voir la différence de taille entre les deux nano-ZnS synthétisées.

En considérant les particules comme des sphères isolées, il est possible d'estimer la surface spécifique ( $S_{spé}$ , en  $m^2/g$ ) des particules à partir de leur surface ( $S$  en  $m^2$ ), leur volume ( $V$  en  $m^3$ ) et la densité des ZnS ( $\rho$  en  $g/m^3$ ):

$$S_{spé} = \frac{S}{\rho * V}$$

La surface spécifique est donc estimée à  $200 m^2/g$  et  $350 m^2/g$  respectivement pour la grande et la petite nano-ZnS d'après les tailles obtenues par MET.

2.3.1.2. Taille des cristallites

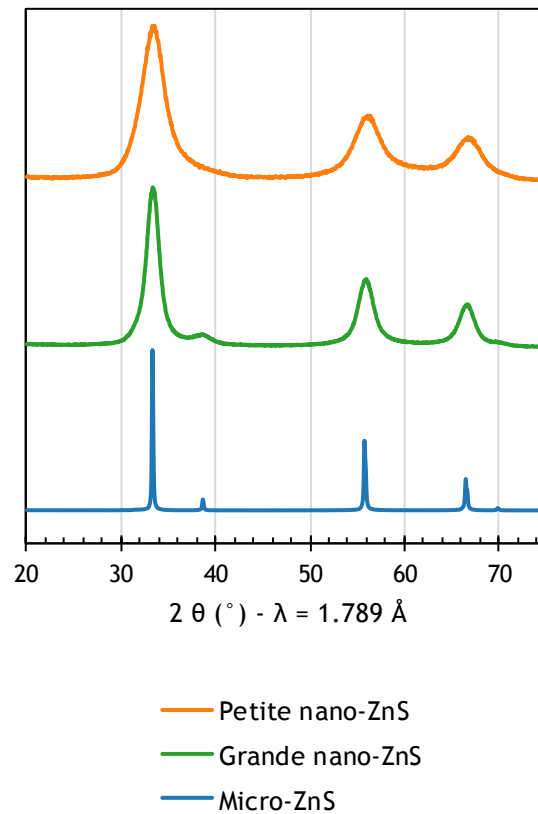


Figure 22 : Diffractogramme de rayons X de chaque particule de ZnS

La largeur des pics de diffraction est croissante pour les échantillons dans l'ordre suivant : micro-ZnS < Grande nano-ZnS < Petite nano-ZnS (Figure 22). Les tailles déterminées par la formule de Sherrer à partir de la largeur à mi-hauteur du pic correspondant au plan (220) sont de 913.8, 54.4 et 29.8 Å respectivement pour la micro-ZnS, la grande et la petite nano-ZnS. Pour la micro-ZnS, la largeur à mi-hauteur ( $2\theta = 0.15^{\circ}$ ) est proche de la largeur instrumentale ( $2\theta = 0.10^{\circ}$ ).

### 2.3.1.3. Contraction du réseau cristallin

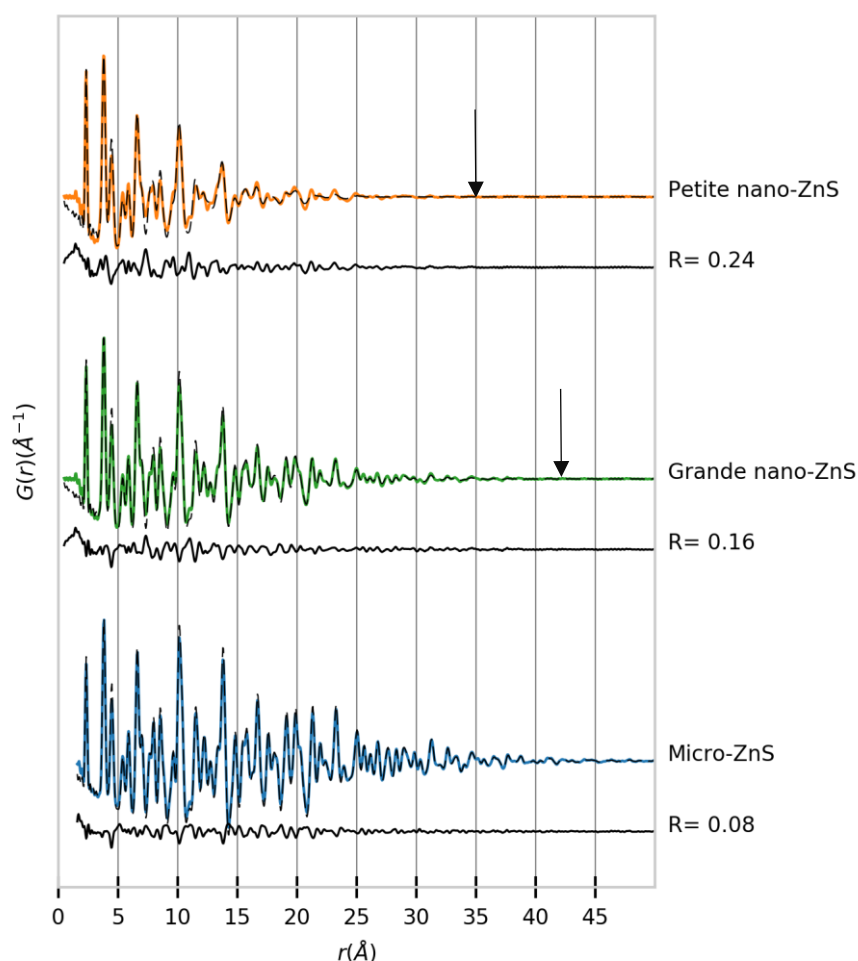


Figure 23 : Fonction PDF correspondant à la micro-ZnS, la Grande nano-ZnS et la petite nano-ZnS avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir).  $R$  est le facteur résiduel de la modélisation

La Figure 23 présente les fonctions PDF des 3 particules. Une première analyse qualitative des signaux met en avant les tailles différentes de ces 3 particules. Pour la micro-ZnS, la fin des oscillations dépasse la limite instrumentale de la PDF : 50 Å. Il n'est donc pas possible de déterminer la taille des cristallites de la micro-ZnS avec la fonction PDF. Les oscillations se terminent à un  $r$  plus élevé pour la Grande nano-ZnS que pour la petite nano-ZnS, ce qui confirme les différences de tailles observées en DRX et en MET. Puis, la modélisation du signal en faisant varier, entre autres, la taille et le paramètre de maille des particules, confirme ces observations. La taille des cristallites est de  $33.6 \pm 3.9$  Å pour la petite nano-ZnS et de  $50.6 \pm 7.7$  Å pour la grande nano-ZnS. Les contractions du réseau cristallin déterminées sont de  $0.326 \pm 0.001$  %,  $0.170 \pm 0.004$  % et  $0.020 \pm 0.001$  % respectivement pour la petite nano-ZnS, grande nano-ZnS et micro-ZnS. Ces résultats, résumés dans le Tableau 10 sont en cohérence avec la tendance observée sur les nano-ZnS dans la partie 2.1.2. c'est-à-dire que plus la taille des particules est petite et plus la contrainte est importante.

#### 2.3.1.4. Surface spécifique

Le Tableau 10 présente les résultats de surface spécifique des 3 particules utilisées pour l'expérience de dissolution.

Pour les deux nano-ZnS synthétisées, la surface spécifique mesurée est moins élevée que la valeur de surface spécifique calculée à partir de la taille des particules obtenue en MET. On observe que les valeurs de surface spécifique sont les mêmes pour les deux nano-ZnS malgré leur différence de taille de cristallites observée en MET, DRX et PDF. Cela doit être dû à l'aggrégation des particules, observée sur les images de MET, qui diminue la surface des nano-ZnS exposée. Cependant, il y a bien une différence de surface spécifique entre les nano-ZnS et la micro-ZnS.

*Tableau 10 : Bilan des résultats de caractérisation de taille et de surface spécifique des 3 particules de ZnS utilisées pour la mesure de cinétique de dissolution*

	<b>Petite nano-ZnS</b>	<b>Grande nano-ZnS</b>	<b>Micro-ZnS</b>
Taille MET (Å)	42	72	-
Taille PDF (Å)	33.6	50.6	> 50
Taille DRX (Å)	29.8	54.4	913.8
Surface spécifique (m <sup>2</sup> /g)	157.35	154.81	1.13
Contraction du réseau cristallin(%)	- 0.32	- 0.17	- 0.02

#### 2.3.2. Cinétique dissolution des 3 particules

La Figure 24 présente le pourcentage de dissolution des 3 particules utilisées en fonction du temps. La totalité des nano-ZnS des deux tailles différentes sont dissoutes dans le milieu en présence de H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> après 50 heures. Il n'y a pas de différence observée entre les cinétiques de dissolution totale des deux nano-ZnS. Cependant, au bout de 50 heures, la dissolution de la micro-ZnS est seulement de 2.6%. Pour déterminer si cette différence est reliée seulement à la taille des particules et donc à la surface disponible pour l'oxydation, la Figure 25 compare la quantité de Zn issu de la dissolution des particules normalisée par unité de surface.



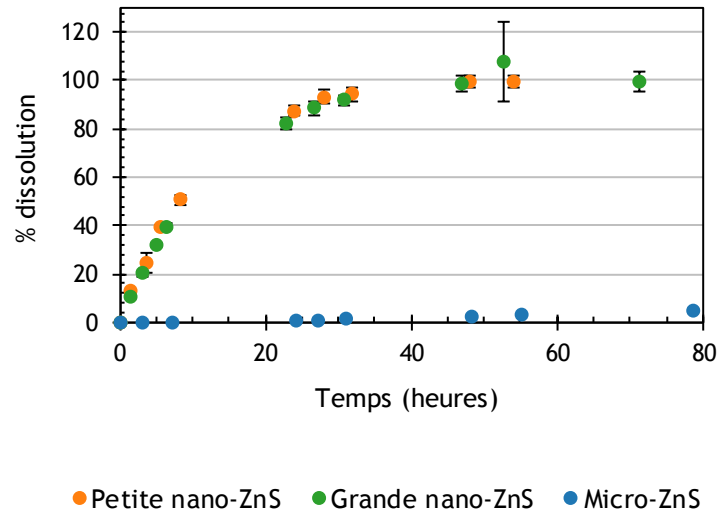


Figure 24 : Pourcentage de dissolution des 3 particules en fonction du temps

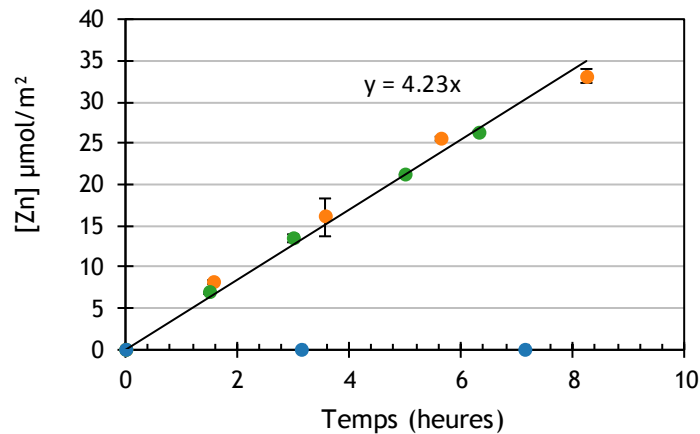


Figure 25 : quantité de Zn issu de la dissolution des particules par unité de surface en fonction du temps.

L'analyse de la dissolution sur les premières heures de la dissolution permet de déterminer la cinétique de dissolution qui est de  $4.23 \pm 0.01 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  ( $R^2=0.99$ ) pour les deux nano-ZnS synthétisées et de  $0 \mu\text{mol}/\text{m}^2/\text{h}$  pour la micro-ZnS. La différence de dissolution pour les nano-ZnS et la micro-ZnS sur les premières heures de la dissolution n'est donc pas seulement liée à un pur effet de surface puisque cette différence reste significative après normalisation par la surface. La Figure 26 présente la quantité de Zn issu de la dissolution des micro-ZnS par unité de surface sur 150 heures. C'est seulement à partir de 24 heures que l'on observe le début de la dissolution des micro-ZnS. Il est à noter que le résultat, pour les premiers points, pour lesquels la concentration en Zn dissous est nulle, pourrait être dû à la limite de détection de l'ICP-AES. Cependant, même en cas de relargage de Zn sur ces 7 premières heures, on observe une accélération de la dissolution à partir de 24 heures. Cette tendance sur les 24 premières heures pourrait être liée à une oxydation de la surface des micro-ZnS nécessaire à l'oxydation du reste de la particule. En effet, la présence d'une couche de soufre à la surface des ZnS peut limiter

la diffusion de composés oxydants vers la surface des ZnS, comme montré par Fowler et Crundwell (1999) pour la diffusion du  $\text{Fe}^{3+}$ .

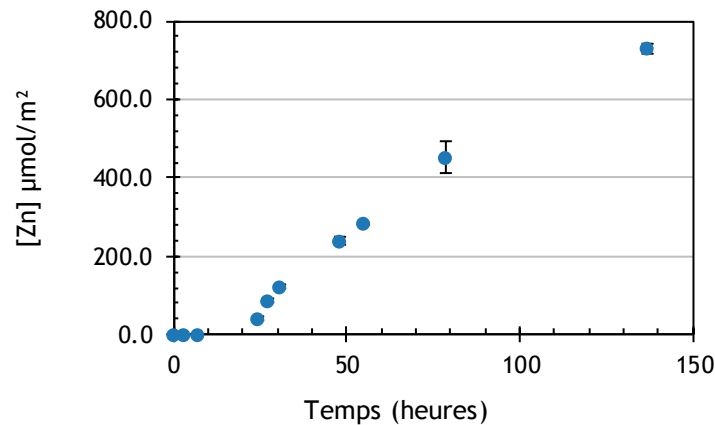


Figure 26 : quantité de zinc issu de la dissolution de la micro-ZnS par unité de surface en fonction du temps

En conclusion, aucune différence de cinétique de dissolution n'est observée entre les deux nano-ZnS malgré leur différence de taille et de contraction du réseau cristallin. Deux hypothèses peuvent expliquer ce résultat :

- La cinétique de dissolution des ZnS dépend uniquement de la surface disponible pour l'oxydation et de la quantité d' $\text{H}_2\text{O}_2$  par unité de surface. Ainsi, même pour des nano-ZnS de différentes tailles, si la surface spécifique est la même à cause de l'agrégation des particules, la taille des particules unitaire n'a aucune influence sur la réactivité malgré les différences de contrainte liées à la différence de taille.
- Le pouvoir oxydant d' $\text{H}_2\text{O}_2$  contrôle la cinétique de dissolution plus que les propriétés intrinsèques des nano-ZnS.

Le temps de latence observé avant le début de la dissolution de la micro-ZnS n'est pas classique et n'est pas observé pour les nano-ZnS. La différence de comportement observée entre les nano-ZnS et la micro-ZnS pourrait être liée à la contrainte observée dans le cas des nano-ZnS qui augmenterait leur réactivité par rapport à la micro-ZnS. En effet, Shi *et al.* (2017) ont montré avec une surface d'anatase ( $\text{TiO}_2$ ) que la contrainte joue un rôle crucial pour la réactivité de surface de l'anatase. De même pour des surfaces de plomb, nickel ou de platine, pour lesquelles les propriétés de sorption et catalytique sont modifiées par la contrainte à la surface de ces matériaux (Bertolini, 2000). Ainsi, la différence de contrainte entre les nano-ZnS et la micro-ZnS pourrait expliquer la différence de temps nécessaire pour oxyder la surface des particules.

Ces résultats ne permettent pas de conclure sur l'influence de la contrainte à la surface des particules sur leur réactivité pour ces deux nano-ZnS. Des expérimentations supplémentaires sont nécessaires afin de trancher sur l'effet de la contrainte sur la réactivité des nano-ZnS. Les conditions expérimentales (synthèse de nano-ZnS,

concentration en ZnS, pH, durée de manip, suivi de la dissolution) ont été optimisées. Ainsi, il sera simple de poursuivre cette étude en limitant la présence d'oxydant tel que  $H_2O_2$  afin d'étudier l'influence des paramètres intrinsèques des nano-ZnS en fonction des conditions d'oxydation.

## Conclusion

Ce chapitre a permis de mettre en évidence la relation entre la taille des particules et les caractéristiques de structure dans l'intervalle de taille (2 à 4 nm) qui a été observé dans les PRO dans le chapitre 2. Par exemple, les nano-ZnS les plus petites sont caractérisées par une contrainte plus forte et de potentielles lacunes d'atomes de Zn. De plus, les molécules organiques qui composent le PRO dans lequel les nano-ZnS se forment ont une influence forte sur la structure des nano-ZnS :

- les groupements thiols stabilisent des nano-ZnS plus petites que celles obtenues sans molécule organique,
- les groupements thiols, méthyl et imidazole interagissent avec la surface des nano-ZnS, ce qui diminue la contraction du réseau cristallin,
- l'influence des molécules organiques est contrôlée par l'encombrement stérique des molécules car ce paramètre détermine le nombre de sites occupés à la surface des nano-ZnS.

Ainsi, le relâchement de la contrainte lié à la présence de molécules organiques pourrait avoir deux effets :

- diminuer la réactivité car l'hypothèse liée à l'état de l'art est que la contrainte augmente la réactivité des nano-ZnS (Chapitre 1, partie 4.1.2. )
- augmenter la réactivité car selon l'état de l'art, le relâchement de la contrainte provoque la création de défauts cristallins qui peuvent également induire la dissolution (Chapitre 1, partie 4.1.2. ).

Pour pouvoir trancher entre ces deux hypothèses, il est nécessaire de déterminer expérimentalement si ces paramètres de structure (contrainte et défauts cristallins) ont une influence sur la réactivité. L'expérience de dissolution montre que dans un intervalle restreint de tailles et de contractions du réseau cristallin qui correspond à l'ordre de grandeur de taille observé dans les PRO, les caractéristiques intrinsèques des nano-ZnS n'ont pas d'influence en présence d'un oxydant fort présent en excès. La cinétique de dissolution est tout de même plus importante sur les premières 10 heures de dissolution pour les nano-ZnS que pour une particule microscopique et bien cristallisée. Il sera nécessaire d'évaluer l'influence des paramètres de structure sans l'influence d'un oxydant en excès. Cette dernière partie met en évidence l'influence majeure de la présence d'un oxydant par rapport aux caractéristiques intrinsèques des nano-ZnS sur la

réactivité. Le chapitre suivant a donc pour objectif de déterminer l'influence des caractéristiques du sol sur le devenir des nano-ZnS.

## Références

- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10), 634-641.
- Banfield, J. F., Zhang, H. (2001). Nanoparticles in the Environment. *Reviews in mineralogy and geochemistry*, 44(1), 1-58.
- Barnard, A. S., Feigl, C. A., Russo, S. P. (2010). Morphological and phase stability of zinc blende, amorphous and mixed core-shell ZnS nanoparticles. *Nanoscale*, 2(10), 2294-2301.
- Bertolini, J.-C. (2000). Surface stress and chemical reactivity of Pt and Pd overlayers. *Applied Catalysis A: General*, 191(1-2), 15-21.
- Fowler, T. A., Crundwell, F. K. (1999). Leaching of Zinc Sulfide by Thiobacillus ferrooxidans: Bacterial Oxidation of the Sulfur Product Layer Increases the Rate of Zinc Sulfide Dissolution at High Concentrations of Ferrous Ions. *Applied and environmental microbiology*, 65(12), 5285-5292.
- Gilbert, B., Huang, F., Lin, Z., Goodell, C., Zhang, H., Banfield, J. F. (2006). Surface Chemistry Controls Crystallinity of ZnS Nanoparticles. *Nano Letters*, 6(4), 605-610.
- Gilbert, B., Huang, F., Zhang, H., Waychunas, G. A., Banfield, J. F. (2004). Nanoparticles: Strained and Stiff. *Science*, 305(5684), 651-654.
- Gondikas, A. P., Masion, A., Auffan, M., Lau, B. L. T., Hsu-Kim, H. (2012). Early-stage precipitation kinetics of zinc sulfide nanoclusters forming in the presence of cysteine. *Chemical Geology*, 329, 10-17.
- Hoefling, M., Iori, F., Corni, S., Gottschalk, K.-E. (2010). Interaction of amino acids with the Au (111) surface: adsorption free energies from molecular dynamics simulations. *Langmuir*, 26(11), 8347-8351.
- Huang, F., Gilbert, B., Zhang, H., Banfield, J. F. (2004). Reversible, Surface-Controlled Structure Transformation in Nanoparticles Induced by an Aggregation State. *Physical Review Letters*, 92(15), 155501.
- Jiang, Q., Liang, L., Zhao, D. (2001). Lattice contraction and surface stress of fcc nanocrystals. *The Journal of Physical Chemistry B*, 105(27), 6275-6277.
- Khalkhali, M., Liu, Q., Zeng, H., Zhang, H. (2015). A size-dependent structural evolution of ZnS nanoparticles. *Scientific reports*, 5, 14267.
- Lombi, E., Donner, E., Tavakkoli, E., Turney, T. W., Naidu, R., Miller, B. W., Scheckel, K. G. (2012). Fate of Zinc Oxide Nanoparticles during Anaerobic Digestion of Wastewater and Post-Treatment Processing of Sewage Sludge. *Environmental science & technology*, 46(16), 9089-9096.
- Masadeh, A., Božin, E., Farrow, C., Paglia, G., Juhas, P., Billinge, S., Karkamkar, A., Kanatzidis, M. (2007). Quantitative size-dependent structure and strain determination of CdSe nanoparticles using atomic pair distribution function analysis. *Physical Review B*, 76(11), 115413.
- Nawrocki, G., Cieplak, M. (2014). Interactions of aqueous amino acids and proteins with the (110) surface of ZnS in molecular dynamics simulations. *The Journal of chemical physics*, 140(9), 03B601\_601.
- Peltier, E., Ilipilla, P., Fowle, D. (2011). Structure and reactivity of zinc sulfide precipitates formed in the presence of sulfate-reducing bacteria. *Applied geochemistry*, 26(9-10), 1673-1680.

- Pham, A. L.-T., Morris, A., Zhang, T., Ticknor, J., Levard, C., Hsu-Kim, H. (2014). Precipitation of nanoscale mercuric sulfides in the presence of natural organic matter: Structural properties, aggregation, and biotransformation. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 133, 204-215.
- Robson, T. C., Braungardt, C. B., Rieuwerts, J., Worsfold, P. (2014). Cadmium contamination of agricultural soils and crops resulting from sphalerite weathering. *Environmental Pollution*, 184, 283-289.
- Shi, Y., Sun, H., Saidi, W. A., Nguyen, M. C., Wang, C. Z., Ho, K., Yang, J., Zhao, J. (2017). Role of Surface Stress on the Reactivity of Anatase TiO<sub>2</sub> (001). *The Journal of Physical Chemistry Letters*, 8(8), 1764-1771.
- Strasser, P., Koh, S., Anniyev, T., Greeley, J., More, K., Yu, C., Liu, Z., Kaya, S., Nordlund, D., Ogasawara, H. (2010). Lattice-strain control of the activity in dealloyed core-shell fuel cell catalysts. *Nature chemistry*, 2(6), 454.
- Voegelin, A., Jacquat, O., Pfister, S., Barmettler, K., Scheinost, A. C., Kretzschmar, R. (2011). Time-Dependent Changes of Zinc Speciation in Four Soils Contaminated with Zincite or Sphalerite. *Environmental science & technology*, 45(1), 255-261.
- Xu, J., Murayama, M., Roco, C. M., Veeramani, H., Marc Michel, F., Donald Rimstidt, J., Winkler, C., Hochella Jr, M. F. (2016). Highly-Defective Nanocrystals of ZnS Formed via Dissimilatory Bacterial Sulfate Reduction: a Comparative Study with their Abiogenic Analogues. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 180, 1-14.
- Zhang, H., Gilbert, B., Huang, F., Banfield, J. F. (2003). Water-driven structure transformation in nanoparticles at room temperature. *Nature*, 424(6952), 1025-1029.

## Annexes

### Résultats de la caractérisation des nano-ZnS

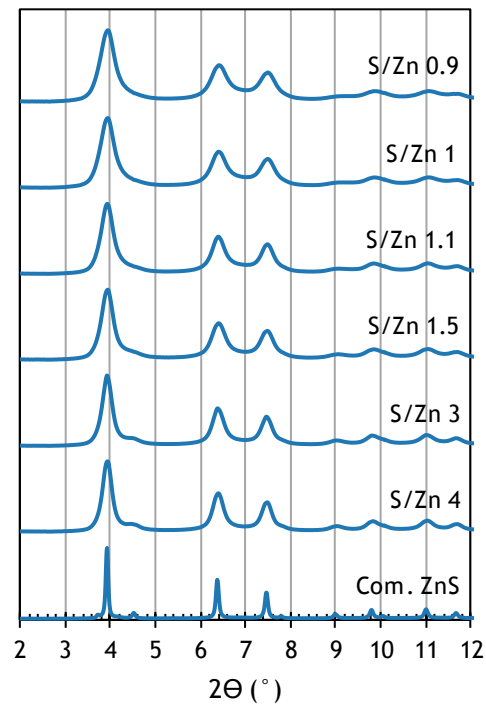


Figure S 1 : Diffractogrammes des nano-ZnS nues (série 1) –  $\lambda=0.2114 \text{ \AA}$

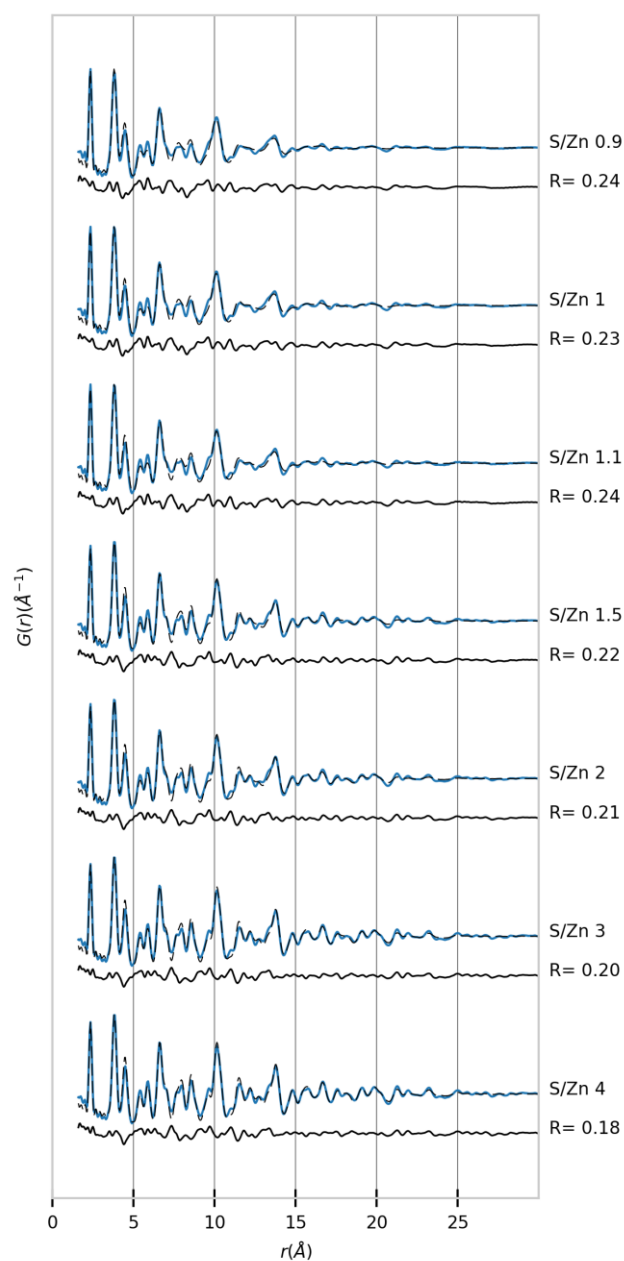


Figure S 2 : Fonction PDF correspondant aux nano-ZnS nues (série 2) avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir). R correspond au facteur résiduel de la modélisation.



Tableau S 1 : Résultats de la modélisation de la PDF (taille et contraction) des échantillons nano-ZnS nues (série 2)

Echantillon	Taille modélisation PDF (Å)	+/-	$\Delta a/a$ (%)	+/-
Nano-ZnS S/Zn 0.9	28.9	2.0	-0.463	0.004
Nano-ZnS S/Zn 1	29.0	2.5	-0.515	0.006
Nano-ZnS S/Zn 1.1	27.3	3.8	-0.363	0.007
Nano-ZnS S/Zn 1.5	30.9	2.8	-0.266	0.001
Nano-ZnS S/Zn 2	31.9	3.3	-0.300	0.001
Nano-ZnS S/Zn 3	35.1	4.8	-0.256	0.001
Nano-ZnS S/Zn 4	36.1	3.4	-0.234	0.001

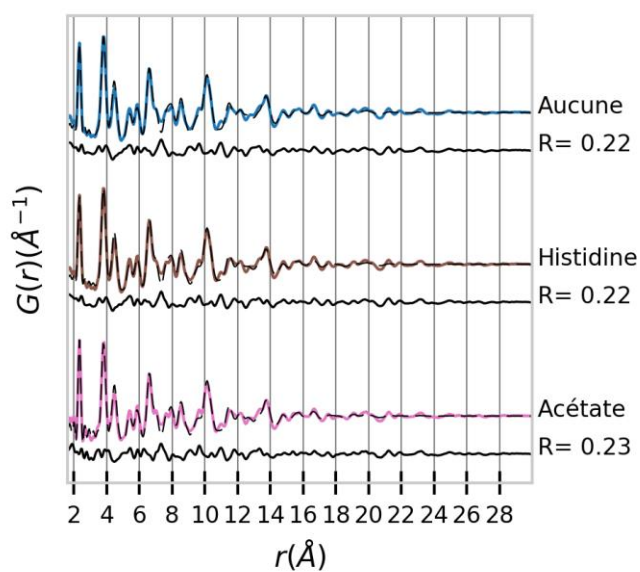


Figure S 3 : Fonction PDF correspondant à la nano-ZnS-témoin (bleu), nano-ZnS-hist (marron) et nano-ZnS-acétate (rose) avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir). R correspond au facteur résiduel de la modélisation.

Tableau S 2 : Tailles et contraction du réseau cristallin des nano-ZnS synthétisées avec les différentes molécules organiques

Echantillon	Taille DRX (Å) +/- 3%	Taille modélisation PDF (Å)	Taille fin des oscillations (Å)	$\Delta a/a$ (%)
Nano-ZnS-témoin	25.2	27.3 +/- 3.8	40.9 +/- 2.3	0.292 +/- 0.006
Nano-ZnS-ser	25.6	27.6 +/- 3.5	39.4 +/- 1.9	0.299 +/- 0.005
Nano-ZnS-cys	15.3	18.6 +/- 2	30.4 +/- 4.5	0.421 +/- 0.021
Nano-ZnS-GSH	17.6	20.7 +/- 2.3	32.5 +/- 4.2	0.280 +/- 0.005
Nano-ZnS-hist	27.1	26.2 +/- 2.3	-	0.246 +/- 0.001
Nano-ZnS-acé	25.6	26.5 +/- 4.8	-	0.216 +/- 0.026

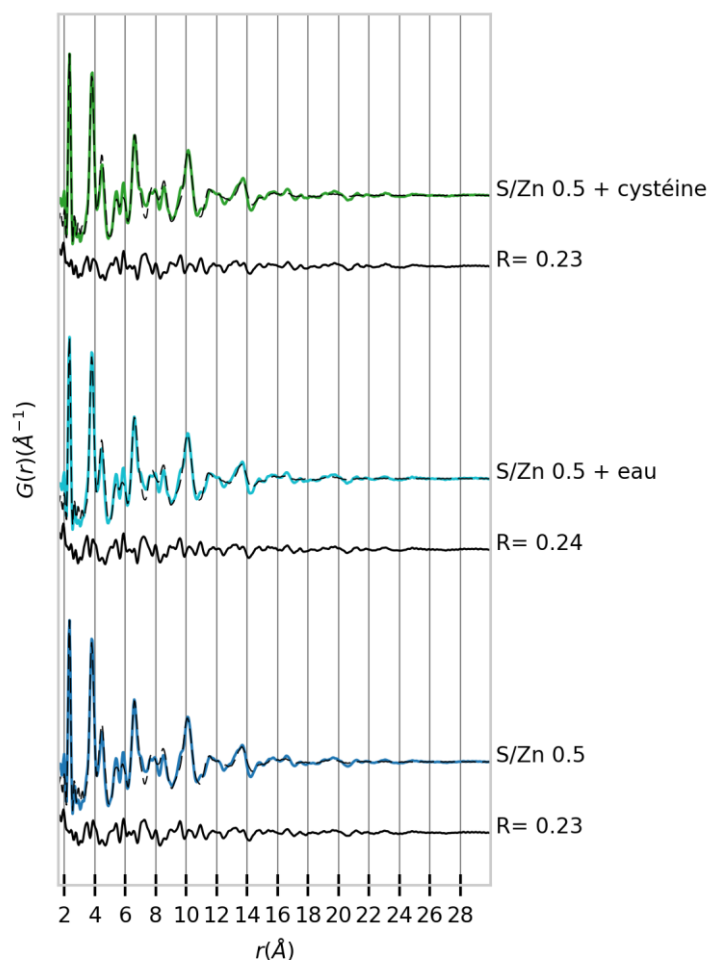


Figure S 4 : Fonctions PDF de la nano-ZnS S/Zn 0.5 (en bleu) avec ajout d'eau (bleu clair) et de cystéine (vert) juste avant la mesure de diffusion totale des rayons X. Le signal modélisé est représenté en pointillés noirs,  $R$  est le facteur résiduel de la modélisation

Tableau S 3 : Résultats de la modélisation de la PDF (taille et contraction) des échantillons nano-ZnS S/Zn 0.5, S/Zn 0.5 + eau, S/Zn 0.5 + cystéine

Echantillon	Taille modélisation PDF (Å)	+/-	$\Delta a/a$ (%)	+/-
Nano-ZnS S/Zn 0.5	27.2	2.0	0.464	0.004
Nano-ZnS S/Zn 0.5 + eau	26.3	1.8	0.484	0.003
Nano-ZnS S/Zn 0.5 + cystéine	25.5	1.6	0.215	0.003

Tableau S 4 : Tailles et contraction du réseau cristallin des nano-ZnS synthétisées avec différentes concentrations en cystéine

Cystéine/Zn	Taille DRX (Å)	Taille modélisation PDF (Å)	Taille fin des oscillations (Å)	$\Delta a/a$ (%)
0	24.8	27.5 +/- 3	39.7 +/- 0.9	0.345 +/- 0.005
0.2	16.5	22.4 +/- 2.6	30.2 +/- 2.4	0.465 +/- 0.006
0.5	15.5	21.5 +/- 1.2	32.1 +/- 2.1	0.430 +/- 0.002
1	14.9	19.9 +/- 2.4	32.1 +/- 2.1	0.435 +/- 0.024

## Calcul du recouvrement des nano-ZnS par les molécules de cystéine

A l'aide d'un calcul théorique, nous estimons la quantité de cystéine nécessaire pour recouvrir toute la surface des nano-ZnS.

Nous considérons une molécule de cystéine sphérique. Ainsi, à l'aide de la densité ( $\rho=1.3 \text{ g/cm}^3$ ) et de la masse molaire ( $M=121.2 \text{ g/mol}$ ), le volume  $V$  de la sphère est le suivant:

$$V_{\text{cystéine}} = \frac{M}{\rho \cdot N} = 1.55 \cdot 10^{-28} \text{ m}^3/\text{molécule}$$

Avec  $N$  le nombre d'avogadro ( $N=6.02 \cdot 10^{23}$ )

Et le rayon  $r$ :

$$R_{\text{cystéine}} = \sqrt[3]{\frac{3V}{4\pi}} = 3.3 \text{ Å}$$

La surface maximale occupée par des molécules de cystéine à la surface des nano-ZnS de rayon  $R_{\text{nano}}$  est égale à la surface de la sphère de rayon ( $R_{\text{nano}} + R_{\text{cystéine}}$ ) représentée

sur la Figure S 5a. qui représente la coupe sur laquelle les molécules se touchent. La Figure S 5b. représente le recouvrement maximal de la surface par des molécules de cystéine représentées par une coupe de la sphère en son centre.

Pour estimer le rapport entre la surface occupée par la cystéine et la surface totale, on considère le triangle équilatéral représenté sur la Figure S 5c qui a pour sommet le milieu de 3 cercles de rayon  $2R_{\text{nano}}$  correspondant aux centres de 3 nano qui se touchent. La base de ce triangle est égale à  $\frac{\sqrt{3}}{2} * 2R_{\text{nano}}$ .

Dans le triangle, la surface correspondant à la cystéine correspond à  $3 * \frac{1}{6}$  de la surface d'un cercle, soit:

$$S_{\text{cystéine}} = \frac{\pi R_{\text{nano}}^2}{2}$$

$$S_{\text{triangle}} = \sqrt{3} * R_{\text{nano}}^2$$

Ainsi, pour une surface donnée, le rapport entre la surface occupée réellement par les molécules de cystéine et la surface totale est le suivant:

$$S_{\text{cystéine}}/S_{\text{triangle}} = \frac{\pi}{2\sqrt{3}} = 0.91$$

Ce rapport est appelé facteur d'encombrement.

Avec la surface de la coupe de la sphère correspondant à la cystéine, le nombre maximal de molécules de cystéines pouvant recouvrir la surface est calculé.

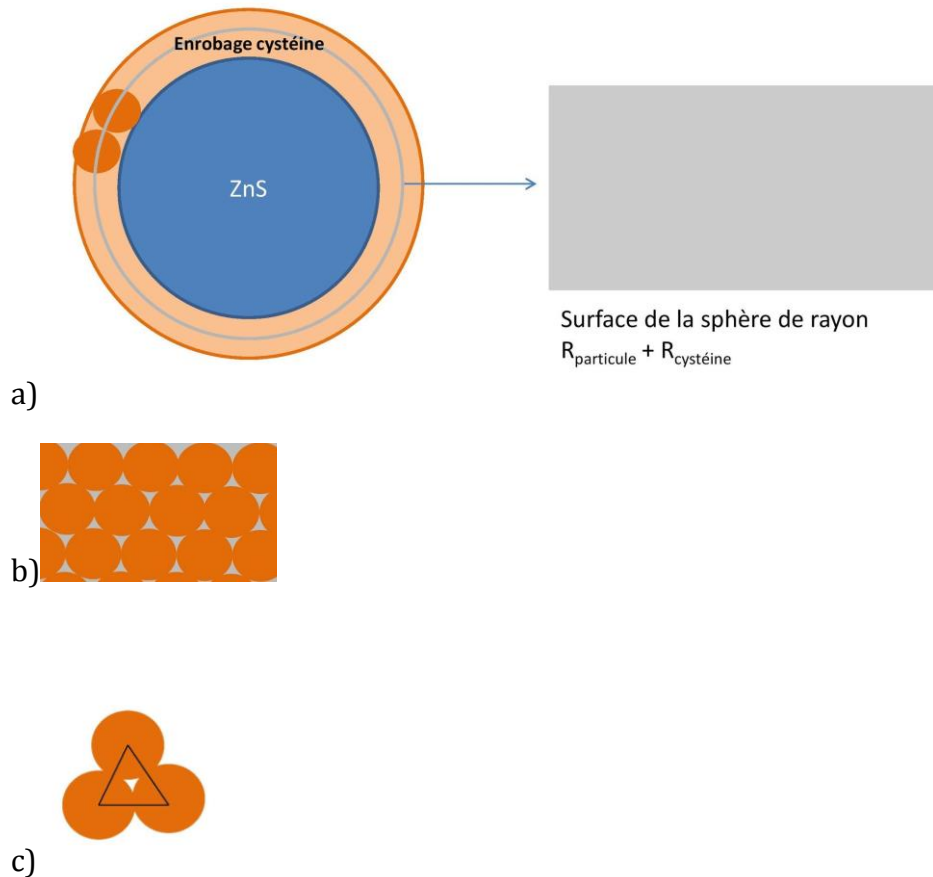


Figure S 5 : représentation du recouvrement de la surface d'une nano-ZnS sphérique par des molécules de cystéine sphériques, a) molécules de cystéine (orange) à la surface des nano-ZnS (bleu), projection de la surface sur laquelle les molécules sphériques de cystéine se touchent (gris), b) Projection de la surface totalement recouverte de molécules de cystéine, c) représentation du triangle équilatéral utilisé pour calculer le facteur d'encombrement des molécules de cystéine.

Pour une particule de nano-ZnS d'un diamètre  $d$  de 2.24 nm, la surface projetée sur laquelle les molécules de cystéine se touchent est de :

$$S = 4\pi(R_{\text{nano}} + R_{\text{cystéine}})^2$$

$$S = 26.53 \text{ nm}^2$$

D'après le facteur d'encombrement de la cystéine, la surface maximale occupée par la cystéine est :

$$S_{\text{cys}} = 26.5 \times 0.91$$

$$S_{\text{cys}} = 24.1 \text{ nm}^2$$

La surface occupée par une molécule de cystéine sur la projection correspond au cercle qui coupe la sphère en son centre ( $S = \pi r^2 = 0.35 \text{ nm}^2$ ), donc le nombre maximal de molécules de cystéine occupant la surface projetée est :

$$n_{\text{cys max}} = 24.1 \text{ nm}^2 / 0.35 \text{ nm}^2 = 69 \text{ molécules} = 69 / N_a = 1.15 \times 10^{-22} \text{ mol}$$

Avec Na le nombre d'Avogadro  $6.02 \times 10^{23}$

Le nombre de moles de Zn dans une particule de nano-ZnS de 2.24 nm a été calculée précédemment ( $0.25 \times 10^{-21}$  mol). Le rapport molaire Cys/Zn nécessaire pour recouvrir totalement la surface des nano-ZnS de 2.24 nm est de :

$$\text{Cys/Zn} = 1.15 \times 10^{-22} / 2.5 \times 10^{-22} = 0.46$$

Ainsi, pour la particule nano-ZnS cys/Zn 0.2 de taille 2.24 nm, la quantité de cystéine présente dans le milieu (Cys/Zn = 0.2) n'est pas suffisante pour recouvrir toute la surface des nano-ZnS. Selon ce calcul théorique, la proportion de surface recouverte est :

$$0.2/0.46 = 43 \%$$

Ce calcul a été reproduit pour les particules nano-ZnS Cys/Zn 0, 0.2, 0.5 et 1 (Tableau S 5).

Tableau S 5 : Résultats des calculs de recouvrement des nano-ZnS par les molécules de cystéine

Nom	Taille (Å)	Nb moles Zn ( $\times 10^{-22}$ )	Surface projetée nano-ZnS (nm <sup>2</sup> )	Surface max occupée par la cystéine (nm <sup>2</sup> )	Nombre de moles de cystéine pour un recouvrement total ( $\times 10^{-22}$ )	Cys/Zn pour un recouvrement total	Surface recouverte
Cys/Zn 0	27.5	4.6	36.7	33.3	1.6	0.35	0 %
Cys/Zn 0.2	22.4	2.5	26.5	24.1	1.15	0.46	43 %
Cys/Zn 0.5	21.5	2.2	24.9	22.6	1.08	0.49	98 %
Cys/Zn 1	19.9	1.7	22.2	20.1	0.96	0.55	100%
Nano-ZnS-cys	18.6	1.4	20.1	18.2	0.86	0.61	100%

D'après ce calcul qui considère qu'une molécule a un encombrement stérique plus important que celui considéré par la méthode du rectangle, les nano-ZnS synthétisées avec un rapport Cys/Zn  $\geq 0.5$  ont leur surface totalement recouverte de molécules de cystéine.

## **Chapitre 4 - Devenir des nano-ZnS dans le sol**





## Sommaire

Introduction.....	175
Partie 1 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à court-terme et à l'échelle du microcosme: influence des caractéristiques du sol .....	177
1. Matériel et méthodes .....	177
1.1. Synthèse des NPs.....	177
1.2. Sols .....	178
1.3. Incubation sol + nano- <sup>68</sup> ZnS en conditions contrôlées.....	180
1.4. Dispositif DGT (Diffusive Gradient in Thin Film).....	181
1.5. Dosage du Zn issu des nano- <sup>68</sup> ZnS.....	182
1.6. Analyse statistique.....	183
2. Résultats et discussion .....	183
2.1. Activité bactérienne et pH .....	183
2.2. Labilité du Zn issu de la dissolution des nano- <sup>68</sup> ZnS.....	187
References.....	195
Partie 2 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à long terme et à l'échelle de la parcelle dans un sol argileux.....	197
Abstract .....	198
Introduction .....	199
1. Materials and methods.....	200
1.1. Field experiment and soil characterization .....	200
1.2. XRD analysis .....	201
1.3. Pig slurry characterization.....	201
1.4. Particle size fractionation of pig slurry.....	202
1.5. SEM-EDS analysis of the pig slurry.....	202
1.6. EXAFS.....	202
1.7. Synthesis and characterization of ZnS nanoparticles .....	203
2. Results and discussion .....	204
2.1. Zn enrichment within the soil due to PS application.....	204
2.2. Pig slurry.....	205
2.2.1. Co-location of Zn and S in sub-micron particle size .....	205

2.2.2. Nano-sized ZnS particles in PS.....	206
2.3. Soil .....	208
2.3.1. Clays dominate the soil mineralogy .....	208
2.3.2. ZnS was not detected in the amended soil.....	208
2.4. Environmental implication .....	212
Conclusion .....	213
Acknowledgements.....	213
Supporting information available .....	214
References.....	215
Supporting Information.....	219
Conclusion .....	220

## Introduction

Les résultats du chapitre 2 montrent que la méthanisation favorise la précipitation de nano-ZnS dans les PRO. La forme nano-ZnS est d'ailleurs la forme principale de zinc (Zn) dans les digestats. Ainsi, l'épandage de digestats sur les sols agricoles donne lieu à la dissémination d'un grand nombre de nanoparticules de ZnS dans le sol étant donné (i) les fortes teneurs en Zn des PRO et (ii) les épandages répétés sur une même parcelle. Cette étude a également mis en évidence la taille des nano-ZnS se formant dans les PRO - environ 3 nm - et la rapide dégradation de ces nano-ZnS en conditions oxydantes. Sachant que pour une taille inférieure à 20-30 nm les nanoparticules peuvent présenter une réactivité de surface largement supérieure à leur homologue bulk (Auffan *et al.*, 2009), la taille des nano-ZnS formées dans les PRO pourrait expliquer leur réactivité et transformation rapide observée pendant le compostage des PRO.

En effet, les résultats du chapitre 3 montrent que les nano-ZnS avec une taille de cristallite de 3 nm se dissolvent en quelques heures dans de l'eau ultrapure en présence d'un oxydant, tandis que des ZnS de taille microscopiques ne se dissolvent pas. Après avoir étudié la dissolution des nano-ZnS dans l'eau ultrapure dans le chapitre précédent, la question de la cinétique de dissolution des nano-ZnS et de leur devenir en termes de disponibilité dans le sol est soulevée. Le sol est une matrice complexe et de nombreux facteurs pourraient influencer la dissolution des nano-ZnS : oxydants tels que  $\text{Fe}^{3+}$ , microorganismes, ligands tels que les argiles ou la matière organique. Il existe une grande variété de sols avec des propriétés différentes. Ainsi, selon le sol sur lequel les digestats sont épandus, la cinétique de dissolution des nano-ZnS pourrait varier. Par exemple, la texture d'un sol peut influencer la capacité à retenir l'eau et les nutriments (WRB, 2015), mais également les communautés bactériennes du sol (Fang *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007). De plus, différents minéraux présents dans les sols peuvent avoir des affinités différentes pour les nano-ZnS ou le Zn dissous (Scheinost *et al.*, 2002; Sipos *et al.*, 2008), ce qui peut provoquer respectivement une rétention ou une dissolution des nano-ZnS.

Pour étudier le devenir des nano-ZnS dans le sol après un épandage de PRO, nous avons travaillé à deux échelles de temps (du mois à la dizaine d'années) et à deux échelles de système (de quelques dizaines de grammes de sol à la parcelle). En effet, l'étude à petite échelle en conditions contrôlées est nécessaire à la compréhension des mécanismes qui contrôlent le devenir des nano-ZnS avec une étude de cinétique. Puis une étude à plus long terme permet de valider les résultats de l'étude mécanistique avec des observations à l'échelle réelle.

Le premier objectif est de comparer le devenir de nano-ZnS synthétisées dans deux sols ayant des compositions contrastées sur 30 jours d'incubation en conditions contrôlées. Le premier sol est un sol tropical argilo-limoneux et le deuxième est un sol sableux. Pour cette incubation de sol en présence de nano-ZnS, les nano-ZnS ont été

synthétisées à partir d'un sel de Zn enrichi en  $^{68}\text{Zn}$ , isotope stable qui représente 18.57 % de l'abondance naturelle du Zn. Cela nous a permis d'ajouter les nano-ZnS en quantités réalistes tout en pouvant distinguer le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS du Zn naturellement présent dans le sol. Pour suivre le Zn labile issu de la dissolution des nano-ZnS au cours du temps, un capteur passif nano-DGT a été déployé.

Le deuxième objectif consiste à étudier le devenir des nano-ZnS à l'échelle réelle et sur une dizaine d'année. Le sol étudié est un sol argileux. Cette parcelle a été soumise à un épandage de lisier de porc pendant 11 ans depuis l'année 2000. D'après les tendances générales décrites dans le chapitre 3, une spéciation du Zn dominée par des nano-ZnS est attendue dans ce lisier de porc stocké dans une lagune en anaérobiose. Ainsi, la comparaison de concentration et spéciation en Zn avec une parcelle non amendée permet de déterminer le devenir du Zn présent dans le lisier de porc dans ce sol argileux. La quantité de Zn apportée sur ces 11 années est suffisante pour pouvoir observer des différences avec la parcelle témoin en utilisant la spectroscopie d'absorption des rayons X, contrairement à l'étude précédente. Ainsi, le devenir des nano-ZnS en terme de spéciation dans le sol et sur le long terme a été déterminé.

Etant donné les échelles spatio-temporelles différentes, deux méthodologies différentes ont été mises en place. C'est pourquoi les méthodes, résultats et discussions de chaque objectif sont présentés dans deux parties différentes avant de conclure plus globalement sur le devenir des nano-ZnS dans le sol.

# Partie 1 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à court-terme et à l'échelle du microcosme: influence des caractéristiques du sol

## 1. Matériel et méthodes

Dans cette partie, les informations nécessaires à la compréhension des résultats sont décrites. Puis, plus de détails sur la préparation des matériaux et sur les méthodes utilisées sont détaillées dans le chapitre 6.

### 1.1. Synthèse des NPs

Les nano-ZnS ont été synthétisées dans un volume de 50 mL suivant le protocole habituel à partir de  $^{68}\text{ZnCl}_2$  préparé à partir de ZnO enrichi en  $^{68}\text{Zn}$  (99.16%) (protocole dans le chapitre 6, paragraphe 1.1.4. ). Les détails de la synthèse sont présentés dans le Tableau 1.

Tableau 1 : Caractéristiques de la synthèse de nano- $^{68}\text{ZnS}$

Nom	Présence d'oxygène	S/Zn	pH synthèse	[ZnS] M	Temps d'agitation (jours)	Purification
nano- $^{68}\text{ZnS}$	Oui	0.9	3.6	0.014	5	Dialyse de 2 jours (1 kDa)

Les nano- $^{68}\text{ZnS}$  ont été caractérisées par DRX. Le diffractogramme a permis d'identifier la sphalérite et de déterminer la taille des cristallites avec la formule de Sherrer: 2.8 nm (Figure 1).

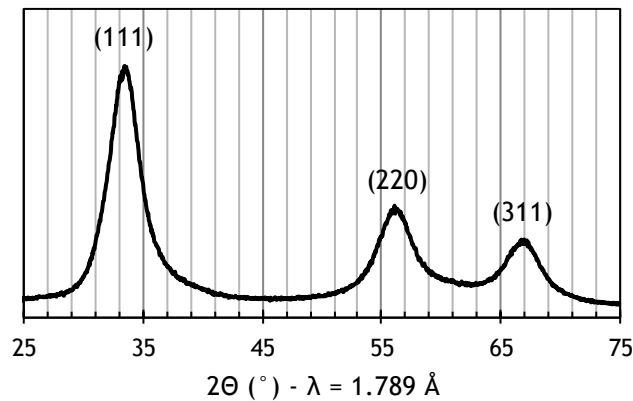


Figure 1 : Diffractogramme de la nano-<sup>68</sup>ZnS

## 1.2. Sols

Les deux sols ont été choisis car ils ont des caractéristiques différentes. Le sol de La Mare est un Nitisol (d'après le système international de classification des sols de la FAO 2014 (WRB, 2015)) et provient d'un site expérimental longue durée (SOERE PRO<sup>1</sup>) situé sur l'île de la Réunion. Le sol de Sangalkam est un Arénosol (WRB, 2015) qui provient également d'un site expérimental du SOERE PRO de la région périurbaine de Dakar (Sénégal). Les sols ont été séchés à 40°C et tamisés à 2mm. Les caractéristiques des sols sont détaillées dans le Tableau 2.

<sup>1</sup> <https://www6.inra.fr/valor-pro/SOERE-PRO-Presentation-de-l-observatoire>

Tableau 2 : Caractéristiques des deux sols choisis

Paramètre		Nitisol	Arénosol
Composition granulométrique	Argiles (%)	42.7	2.9
	Limons (%)	46.5	1.0
	Sable (%)	10.8	96.2
	Classification granulométrique	Argilo-limoneux	Sableux
Composition minéralogique (Figure 2)	Oxydes de fer	Magnétite, hématite, ilménite, goethite	
	Oxydes d'aluminium	Gibbsite	
	Silicates	Quartz, Halloysite, Kaolinite, Feldspath	Quartz, muscovite, montmorillonite, Kaolinite
Horizon		0-10 cm	0-20 cm
[C <sub>org</sub> ] %		2.3	0.5
[Zn] mg.kg <sup>-1</sup>		170	23
CMR <sup>1</sup> (%)		45	32
CEC <sup>2</sup> cmol(+)/kg <sup>-1</sup>		10.6	3.2
pH mesuré dans l'eau		6.1	7.7
pH mesuré dans KCl		4.8	7.6

<sup>1</sup> Capacité maximale de rétention d'eau, protocole disponible Chapitre 6, paragraphe 1.2.

<sup>2</sup> Capacité d'échange cationique

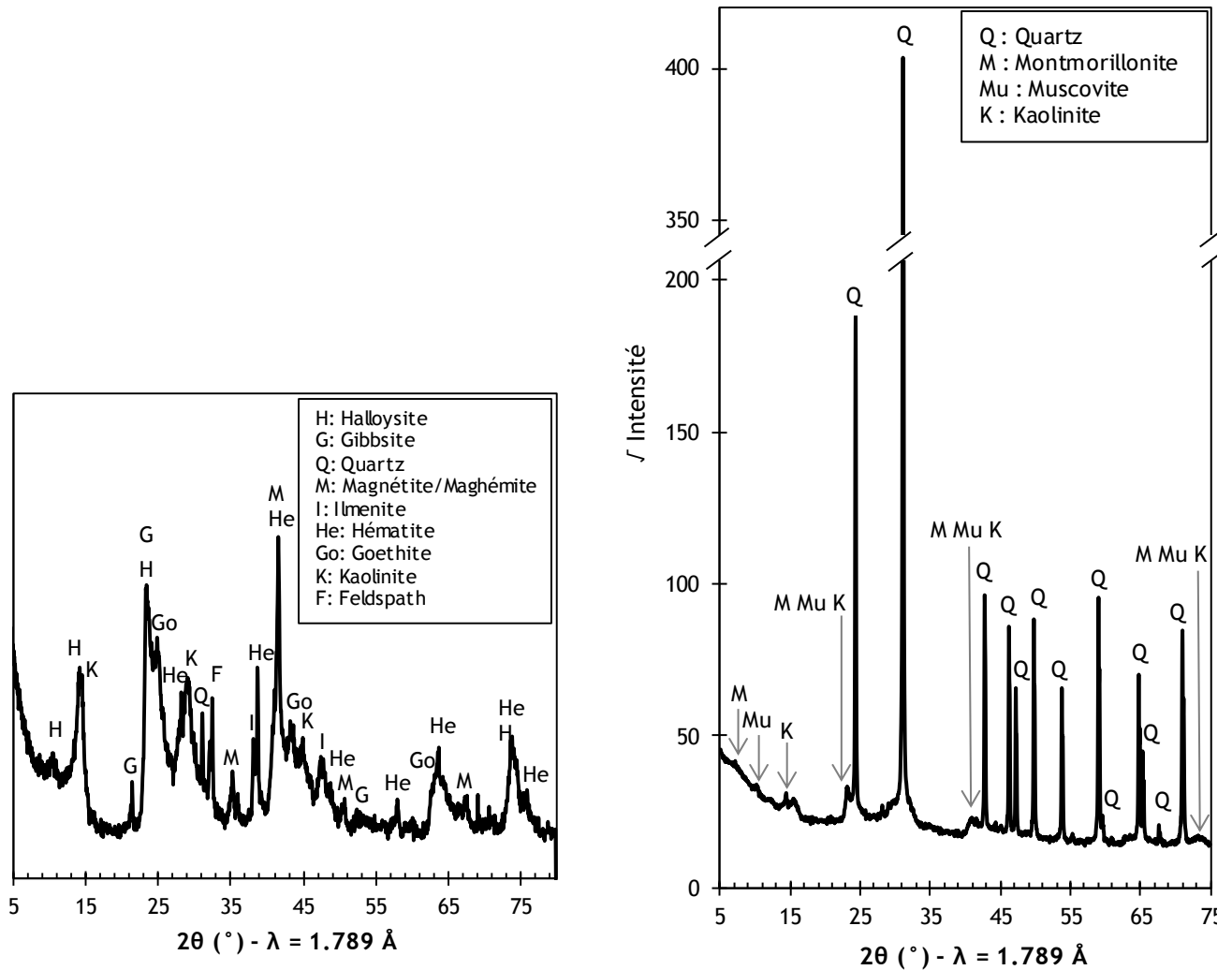


Figure 2 : diffractogrammes (a) du Nitisol, (b) de l'Arénosol (X Pert Pro,  $\lambda=1.789\text{\AA}$ )

### 1.3. Incubation sol + nano- $^{68}\text{ZnS}$ en conditions contrôlées

Les deux sols ont été incubés avec nano- $^{68}\text{ZnS}$  (sol + NP) ou sans (sol témoin). Pour chacun des 5 points de cinétique, des microcosmes ont été démantelés. Au total, 80 microcosmes de 30g de sol sec (5 dates\*2 sols\*2 modalités\*4 répliques) ont été préparés. Les 4 différentes conditions étaient les suivantes :

- Nitisol témoin,
- Nitisol + NP,
- Arénosol témoin,
- Arénosol + NP.

Avant le démarrage de l'incubation, les sols secs ont été rigoureusement mélangés avec les nano- $^{68}\text{ZnS}$  sous forme séchée pour atteindre une concentration en nano- $^{68}\text{ZnS}$  dans le sol de 15 mg/kg de sol sec. Le mélange a été fait avec les matériaux sous forme



séchée afin d'optimiser l'homogénéité du mélange sol + nano-<sup>68</sup>ZnS. Cette quantité d'apport de nano-<sup>68</sup>ZnS a été choisie pour simuler un épandage d'un PRO contenant 1000 mg/kg<sub>MS</sub> de Zn et épandu à 1% en masse sur un sol. Cela représente donc 10 mg de Zn par kg de sol sec, donc 15 mg/kg de ZnS. Dans chaque microcosme, il y a un dispositif de DGT comportant une membrane de dialyse à 1kDa pour filtrer les nano-<sup>68</sup>ZnS placé dans le fond, et l'équivalent de 30g de sol sec tassé au-dessus de lu disposititif DGT pour atteindre la densité indiquée dans le Tableau 3, puis humidifié en ajoutant de l'eau ultrapure de façon à obtenir les taux d'humidification indiqués dans le Tableau 3. Pour le Nitisol, le taux d'humidification, 70% de la CMR, a été choisi par rapport à de précédentes études pour le Nitisol (Inselsbacher *et al.*, 2009; Doelsch *et al.*, 2010; Tella *et al.*, 2016). Pour l'Arénosol, le taux d'humidification était plus faible car la proportion d'eau gravitaire est plus importante dans un sol sableux que dans un sol argilo-limoneux (Kirkham, 2014).

Tableau 3 : Caractéristiques des sols

Sol	Humidification	Densité volumique (g/cm <sup>3</sup> )
Nitisol	70 % de la CMR	1.3
Arénosol	54 % de la CMR	2.1

Les microcosmes ont été incubés dans une enceinte thermostatée à 28°C pendant 1, 3, 7, 14 ou 28 jours. A chaque point de cinétique et pour chacune des 4 conditions, 4 répliques sont sacrifiées pour effectuer les étapes suivantes:

- La solution de sol des 4 répliques a été récupérée par centrifugation, rassemblée et filtrée pour la mesure du pH et dosage du Zn par ICP-MS<sup>1</sup>,
- l'activité microbienne a été mesurée sur le sol humide par hydrolyse de la Fluorescéine Diacétate (FDA); le produit de cette hydrolyse, la fluorescéine, a été dosée par absorbance<sup>2</sup>,
- La résine du dispositif DGT a été récupérée et éluée. Le rapport <sup>68</sup>Zn/<sup>66</sup>Zn dans la solution d'éluion de la résine a été mesuré par ICP-MS.

#### 1.4. Dispositif DGT (Diffusive Gradient in Thin Film)

Le dispositif DGT<sup>3</sup> est un capteur passif qui permet de doser les éléments labiles dans des matrices environnementales telles que le sol. Il est composé d'une résine Chelex échangeuse de cations, d'un gel de diffusion, d'une membrane filtrante de 0.2 µm et d'une

<sup>1</sup> Protocole détaillé: Chapitre 6, paragraphe 2.2.3.

<sup>2</sup> Protocole détaillé: Chapitre 6, paragraphe 2.2.4.

<sup>3</sup> Dispositif présenté en détails : Chapitre 6, 2.2.2.

membrane de dialyse à 3 kDa qui permet d'éviter la diffusion des nano-ZnS au travers du gel. La membrane de dialyse a déjà été associée au dispositif DGT dans d'autres études pour filtrer des nanoparticules (Pouran *et al.*, 2014; Sekine *et al.*, 2014). Ces composants sont assemblés sur un support en plastique. Le dispositif est placé dans le fond du microcosme et le sol a été tassé par-dessus. A chaque point de cinétique, le dispositif est démonté pour récupérer la résine qui est éluée dans une solution acide (HNO<sub>3</sub> 1N) pendant 24 heures à 20°C avant dilution dans une matrice HNO<sub>3</sub> à 2% avant mesure du rapport <sup>68</sup>Zn / <sup>66</sup>Zn en ICP-MS.

## 1.5. Dosage du Zn issu des nano-<sup>68</sup>ZnS

Le rapport des masses 68 et 66 est mesuré par spectrométrie de masse ICP avec l'appareil NexION 300x (Perkin Elmer) pour chaque éluat de résine de DGT. Cette approche a été choisie car la mesure des rapports isotopiques est plus sensible que la mesure des intensités sur une seule masse.

Dans les éluats de résine, il y a du Zn provenant du traceur (Zn<sub>tr</sub>), c'est-à-dire le Zn labile provenant de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS, ainsi que le Zn naturel (Zn<sub>nat</sub>), c'est-à-dire le Zn labile naturellement présent dans le sol. L'incertitude déterminée sur la concentration en Zn naturel est inférieure à 20%. Donc la masse de Zn total (Zn<sub>tot</sub>) correspond à la somme du Zn provenant du traceur et du Zn naturel :

$$m(\text{Zn}_{\text{tot}}) = m(\text{Zn}_{\text{tr}}) + m(\text{Zn}_{\text{nat}})$$

Le rapport  $R_{\text{mélange}}$  correspond au rapport <sup>68</sup>Zn/<sup>66</sup>Zn mesuré dans l'éluat normalisé par rapport aux blancs et au biais de masse<sup>1</sup>. La masse de Zn naturel ( $m(\text{Zn}_{\text{nat}})$ ) dans l'échantillon est déterminée à partir de l'intensité mesurée pour la masse 66 et d'une calibration établie à partir d'une solution de Zn naturel. Puis, à partir de  $R_{\text{mélange}}$  et de  $m(\text{Zn}_{\text{nat}})$  dans l'éluat, il est possible de calculer la masse de Zn de l'éluat provenant de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS,  $m(\text{Zn}_{\text{tr}})$  avec l'équation<sup>1</sup>:

$$\frac{m(\text{Zn}_{\text{tr}})}{m(\text{Zn}_{\text{nat}})} = \frac{M(\text{Zn}_{\text{tr}})}{M(\text{Zn}_{\text{nat}})} * \frac{Ab_{\text{nat}}^{66}}{Ab_{\text{tr}}^{66}} * \frac{(R_{\text{nat}} - R_{\text{mélange}})}{(R_{\text{mélange}} - R_{\text{tr}})}$$

Avec:

$m(\text{Zn}_{\text{tr}})$ : la masse de Zn provenant du traceur (nano-<sup>68</sup>ZnS)

$m(\text{Zn}_{\text{nat}})$ : la masse de Zn naturel

$M(\text{Zn}_{\text{tr}}), M(\text{Zn}_{\text{nat}})$ : masses molaires

$Ab_{\text{tr}}^{66}, Ab_{\text{nat}}^{66}$ : abondances de l'isotope 66 pour le traceur (0.08%) et pour le Zn naturel (27.8%)

$R_{\text{nat}}$ : le rapport 68/66 mesuré dans une solution de Zn naturel

$R_{\text{mélange}}$ : le rapport 68/66 dans l'éluat de résine (mélange Zn naturel et Zn provenant du traceur)

<sup>1</sup> Détails de la mesure, normalisation du rapport et démonstration de la formule : Chapitre 6, 3.2.2.2.

$R_{tr}$ : le rapport 68/66 mesuré pour le traceur seul (solution de  $^{68}\text{ZnCl}_2$  utilisée pour la synthèse des nano- $^{68}\text{ZnS}$ )

## 1.6. Analyse statistique

Le logiciel XLSTAT a été utilisé pour comparer les résultats de concentration en fluorescéine ( $n=16$ ), masse de Zn provenant du traceur ( $n=20$ ) et masse de Zn total sur la DGT ( $n=20$ ). Le test de Kruskal-Wallis (niveau de signification : 5%) a été utilisé pour la comparaison de l'ensemble des échantillons par rapport à un paramètre ([Fluorescéine],  $m_{\text{Zn traceur}}$ ,  $m_{\text{Zn nat}}$ ). Les quatre valeurs correspondant aux quatre réplicas ont été utilisées pour les comparaisons. En cas de rejet de l'hypothèse nulle de Kruskal-Wallis ( $H_0$  : les échantillons proviennent de la même population), un test post hoc a été utilisé pour des comparaisons multiples par paires suivant la procédure de Conover-Iman. Les p-values obtenues ont été comparées au niveau de signification corrigé de Bonferroni ( $\alpha_B = 0.0004$  pour la comparaison de [Fluorescéine],  $\alpha_B = 0.0003$  pour la comparaison de  $m_{\text{Zn traceur}}$  et  $m_{\text{Zn total}}$ ) afin de conclure sur une différence significative entre deux échantillons.

## 2. Résultats et discussion

### 2.1. Activité bactérienne et pH

L'activité bactérienne a été mesurée dans les sols car ce paramètre est susceptible d'influencer la dissolution des nano-ZnS. Le pH permet de suivre l'évolution des conditions physico-chimiques du sol au cours du temps.

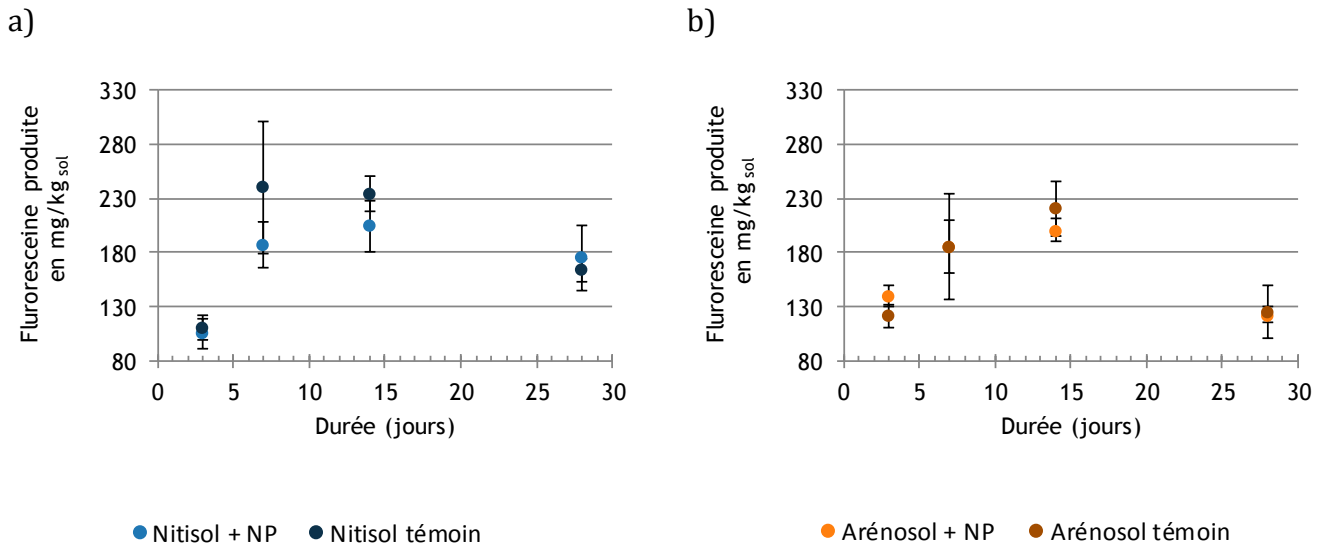


Figure 3 : Quantité de fluorescéine produite (mg/kg<sub>sol</sub>) illustrant l'activité bactérienne totale du sol dans (a) le Nitisol + NP ou Nitisol témoin et dans (b) l'arénosol + NP ou l'Arénosol témoin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des valeurs des 4 réplicas.

La Figure 3 et l'analyse statistique montrent qu'il n'y a aucune différence significative d'activité bactérienne mesurée par l'hydrolyse de la FDA entre un sol témoin et un sol contenant les nano-ZnS que ce soit le Nitisol (Figure 3a) ou l'Arénosol (Figure 3b). L'ajout de nano-ZnS à une concentration de 15 mg/kg<sub>sol</sub> n'a donc pas eu d'influence sur l'activité bactérienne totale, bien qu'il y ait pu y avoir un impact négatif sur l'activité d'une communauté bactérienne spécifique et positif sur l'activité d'une autre communauté. Les résultats montrent également que l'activité bactérienne augmente fortement pendant les 14 premiers jours pour les 4 conditions, ce qui correspond au rétablissement de l'activité biologique suite à la ré-humidification du sol (Mikha *et al.*, 2005). Puis, l'activité bactérienne se stabilise et diminue en fin d'incubation. Cette tendance a déjà été observée pour un sol argilo-limoneux par Fang *et al.* (2007). Cette étude avait mesuré le dégagement de CO<sub>2</sub> par des microcosmes de sol de différentes textures et dans des conditions similaires à notre étude (c'est-à-dire sans pré-humectation du sol avant l'incubation). Cependant, pour un sol limono-sableux, se rapprochant plus de la texture de l'Arénosol, ces auteurs observaient un maximum d'activité bactérienne dès 3 jours d'incubation puis un déclin après 3 semaines comme observé sur la Figure 3b. Ce déclin pourrait s'expliquer par une stabilisation de l'activité microbienne après une stimulation due à la libération de composés organiques disponibles issues de cellules mortes et rapidement dégradés par les cellules réactivées par l'humidification du sol (Mikha *et al.*, 2005).

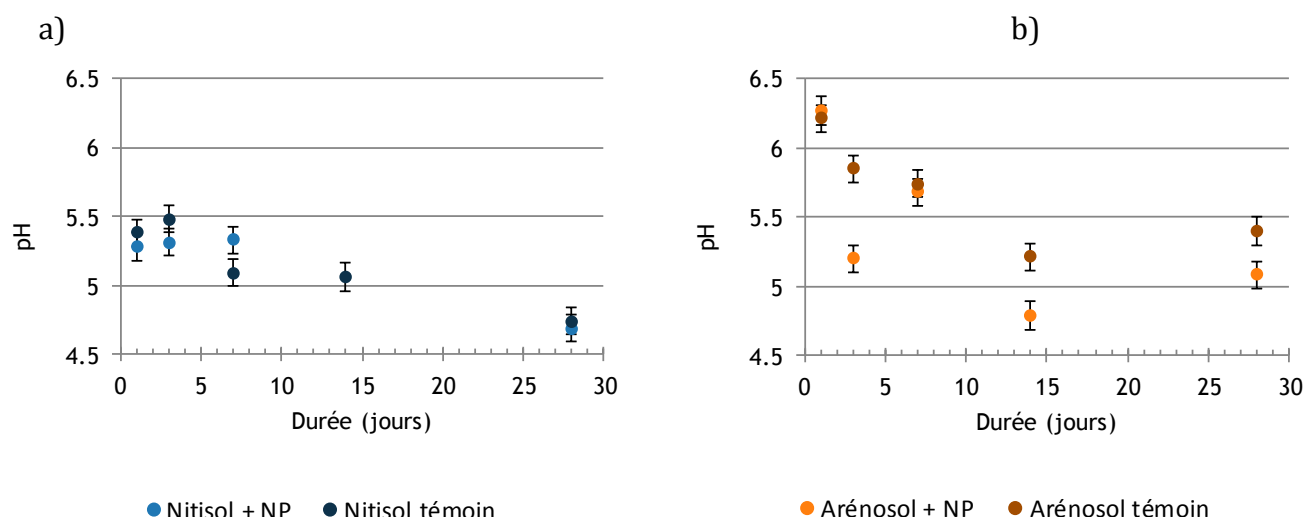


Figure 4 : pH mesuré dans la solution de sol du sol du (a) Nitisol + NP ou du Nitisol témoin et de (b) l'Arénosol + NP ou de l'Arénosol témoin. Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude sur la mesure de pH (0.1)

La Figure 4 présente l'évolution du pH dans la solution de sol. Pour le Nitisol (Figure 4a), le pH est de 5.3 et 5.4 respectivement pour le sol + NP avec et le sol témoin. Pour le sol +NP, le pH reste stable les 7 premiers jours tandis que pour le sol témoin, le pH diminue à 5.1 après 7 jours avant de se stabiliser. Pour les 2 conditions, le pH a fortement diminué à 4.7 au jour 28. Ce profil d'évolution du pH de la solution de sol avait déjà été observé par Tella *et al.* (2016) avec une baisse de pH de -0.8 pour ce même sol. Comme pour l'activité bactérienne, il n'y a pas de différence de pH entre le Nitisol et le Nitisol + NP.

Pour l'Arénosol (Figure 4b), la valeur initiale du pH du sol est identique (6.3 et 6.2 respectivement pour les sols avec et sans nano-ZnS). Puis le pH diminue jusqu'à 5.2 pour le sol témoin au cours des 15 premiers jours d'incubation et plus brusquement jusqu'à 5.2 après seulement 2 jours pour le sol + NP. La tendance pour le sol + NP n'est pas stable car le pH augmente à 5.7 après le J3 et diminue après le jour 7 (pH=4.8). Puis, pour les 2 conditions, le pH réaugmente à 5.1 et 5.4 respectivement pour le sol + NP et le sol témoin en fin d'incubation. Cette augmentation du pH concorde avec la baisse d'activité bactérienne observée après le 14<sup>ème</sup> jour d'incubation. A partir de cette date, on observe également un écart de -0.4 et -0.3 pour le pH de l'Arénosol + NP par rapport à l'Arénosol témoin. Cette baisse du pH dans l'Arénosol + NP à partir de 14 jours d'incubation pourrait avoir pour cause la présence de nano-ZnS. En effet, les nano-ZnS peuvent avoir une influence sur les transformations physico-chimiques du sol, par exemple la réaction de dissolution et/ou la précipitation du Zn peut provoquer la libération de protons.

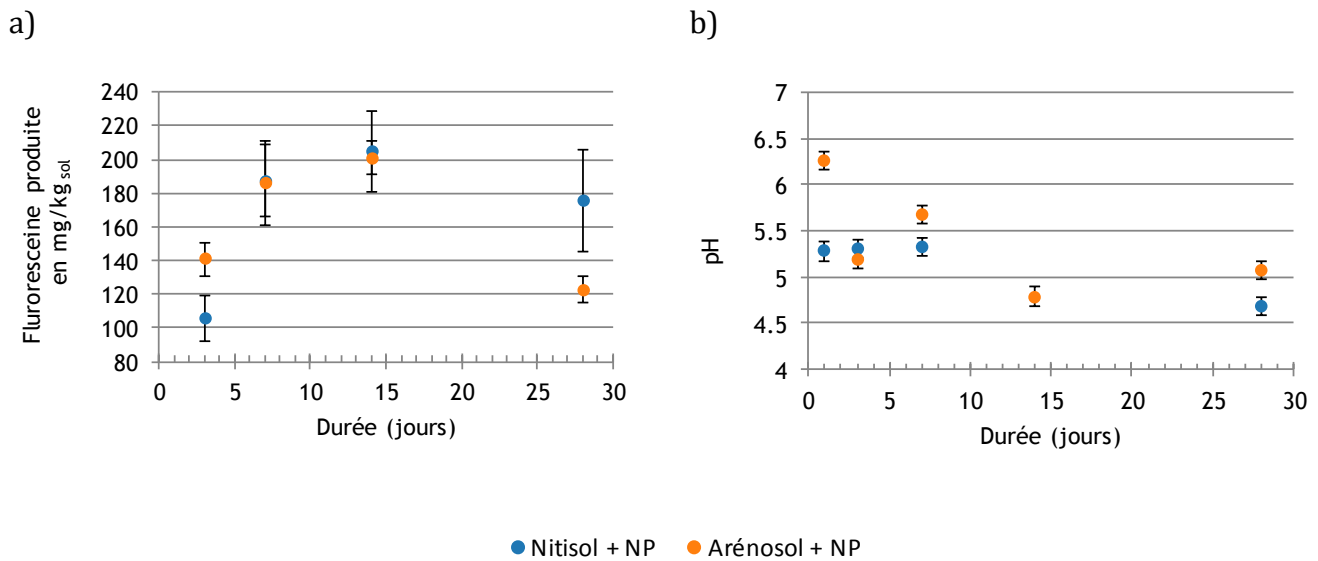


Figure 5 : Comparaison (a) de la fluoresceine produite illustrant l'activité microbienne totale des 2 sols + NP et (b) du pH de la solution de sol dans les 2 sols + NP. La barre d'erreur représente l'écart-type des valeurs des 4 réplicas pour (a) et l'incertitude de mesure du pH (0.1) pour (b).

La Figure 5a compare l'activité microbienne totale dans les 2 différents sols +NP. La tendance est la même pour les 2 sols : augmentation de l'activité pendant les 14 premiers jours puis diminution de l'activité bactérienne au cours des 14 derniers jours. Les seules différences sont au jour 3 pour lequel l'activité microbienne de l'Arénosol est plus importante et pour le jour 28 pour lequel l'activité microbienne du Nitisol est plus importante. Cependant, ces différences ne sont pas significatives d'après l'analyse statistique. Généralement, l'activité microbienne est plus faible dans les sols sableux tels que l'Arénosol que dans les sols riches en argiles et en matière organique comme le Nitisol (Green *et al.*, 2006; Fang *et al.*, 2007; Labud *et al.*, 2007). Cependant, dans le cas de cette incubation, nous pouvons conclure sur une activité microbienne équivalente dans les deux sols qui suit la même tendance au cours des 30 jours d'incubation.

La Figure 5b compare les pH des solutions des 2 sols différents. Le pH est plus élevé au début de l'incubation pour l'Arénosol (6.3) puis tend vers la valeur de pH du Nitisol (5.3) au cours du temps. Malgré la différence importante de pH au 1<sup>er</sup> jour d'incubation, la différence de pH entre les deux sols reste faible (0.4 au maximum) et nous pouvons conclure que leur pH est équivalent.

## 2.2. Labilité du Zn issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS

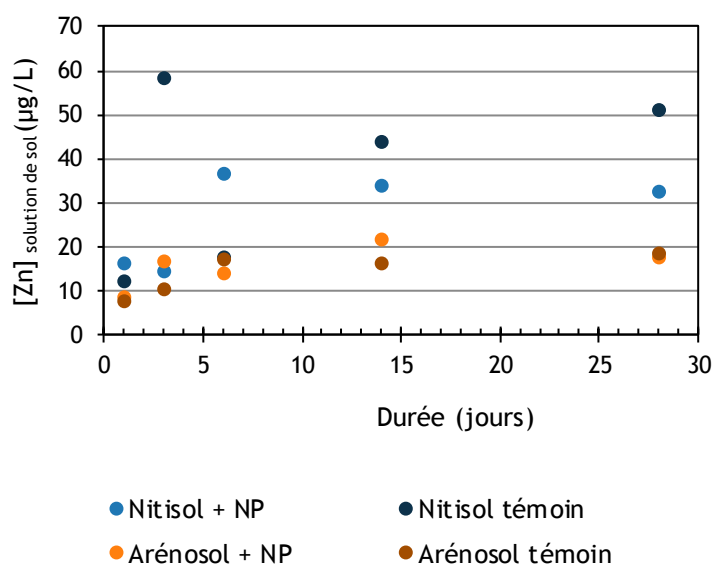


Figure 6 : Evolution de concentration en Zn au cours du temps dans la solution pour les 4 différentes conditions

La Figure 6 présente la concentration en Zn dans la solution de sol aux différentes dates. A partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation, la concentration en Zn est plus élevée dans la solution de sol du Nitisol (témoin et avec NP) que dans celle de l'Arénosol (témoin et avec NP). Les concentrations en Zn dans la solution de sol sont proches dans les sols +NP et dans leur homologues témoin, la présence de Zn issu de la dissolution des nano-ZnS n'est donc pas détectable (par exemple au 28<sup>ème</sup> jour pour l'Arénosol et le Nitisol). Après 14 jours d'incubation, la Figure 6 montre que les concentrations en Zn dans la solution de sol sont de 34 µg/L pour le Nitisol + NP et de 22 µg/L pour l'Arénosol + NP. Ces concentrations sont inférieures à la concentration la plus faible en Zn dans la solution de sol qui diminue significativement la quantité de rhizobiums de pois et de trèfle dans l'étude de Chaudri *et al.* (2000) : 600 µg/L. Les concentrations en Zn mesurées dans les solutions de sols sont également inférieures à la concentration en Zn dans la solution de culture de pois en hydroponie (filtrée à 0.2µm) provoquant une réduction de moitié de longueur des racines, 1046 µg/L (Kopittke *et al.*, 2014). Les concentrations en Zn dans la solution de sol ne seraient donc pas toxique par rapport aux seuils de toxicité déterminés par ces deux études sur le pois et le trèfle. En considérant la différence de concentration entre l'Arénosol + NP et l'Arénosol témoin aux 3<sup>ème</sup> et 14<sup>ème</sup> jours d'incubation (6µg/L) comme l'augmentation de Zn dans la solution de sol causée par l'apport de nano-ZnS, environ 100 et 170 apports de cette dose de nano-ZnS sur l'Arénosol seraient nécessaires pour atteindre les seuils de toxicité déterminés par Chaudri *et al.* (2000) et Kopittke *et al.* (2014), respectivement. Il est toutefois difficile d'établir un risque à partir de la concentration dans la solution de sol qui n'est pas forcément représentative de la quantité de Zn labile. En effet le risque est, par définition, une combinaison de l'exposition à une substance et de la toxicité de cette substance, qui dépendent de la disponibilité du Zn.

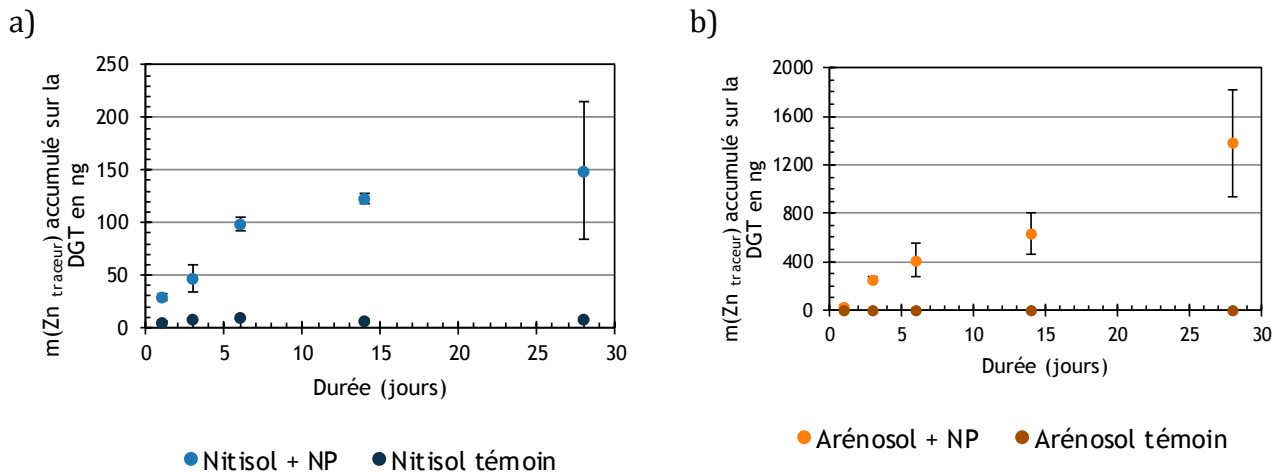


Figure 7 : Quantité de zinc issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS accumulée sur la DGT en contact du (a) Nitisol + NP et du Nitisol témoin, de (b) l'Arénosol + NP et de l'Arénosol témoin

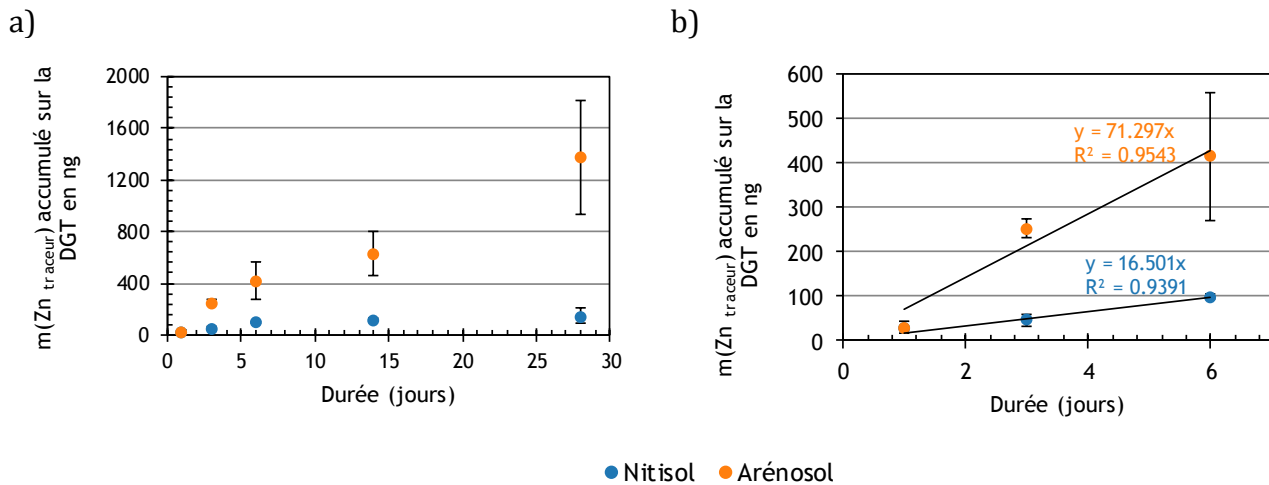


Figure 8 : Quantité de zinc issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS accumulée sur la DGT en contact (a) des deux sols + NP pour comparaison (b) des deux sols sur les 6 premiers jours d'incubation

La quantité de Zn issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS est présentée pour chaque type de sol sur les Figure 7 et Figure 8. Sur les Figure 7a et b, les résultats montrent que la quantité de Zn labile provenant des nano-<sup>68</sup>ZnS est significativement plus élevée dans le sol +NP que dans le sol témoin quelle que soit la date considérée ( $p < 0.0001$ ). Cela signifie que dans les deux sols, les nano-<sup>68</sup>ZnS commencent à se dissoudre dès 24 heures d'incubation. Le couplage du traçage isotopique et du capteur DGT était donc nécessaire pour observer la dissolution des nano-ZnS. Pour le Nitisol, la quantité de Zn labile provenant des nano-<sup>68</sup>ZnS se stabilise à partir de 14 jours tandis qu'elle continue de croître au 28<sup>ème</sup> jour d'incubation pour l'Arénosol.

Pour l'Arénosol, la quantité de Zn labile provenant des nano-<sup>68</sup>ZnS est significativement plus importante que pour le Nitisol dès le 3<sup>ème</sup> jour d'incubation ( $p < 0.0001$ ) et l'écart continue d'augmenter au cours du temps jusqu'à atteindre un facteur 10 au 28<sup>ème</sup> jour d'incubation (Figure 8a). La Figure 8b montre l'évolution de la quantité de Zn labile issu des nano-<sup>68</sup>ZnS au cours des 6 premiers jours d'incubation. La pente est



plus grande pour l'Arénosol (71.3 ng Zn/jour) que pour le Nitisol (16.5 ng Zn/jour). Cette observation peut s'expliquer par deux hypothèses:

- (i) Cinétique de dissolution différente : les nano-<sup>68</sup>ZnS se dissolvent plus vite dans l'Arénosol que dans le Nitisol.
- (ii) Diffusion différente : la cinétique de dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS est similaire mais la diffusion du Zn issu de la dissolution jusqu'à la résine de la DGT est moins importante dans le Nitisol que dans l'Arénosol à cause d'une sorption favorisée (une fraction du Zn labile issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS est retenue par les ligands présents dans le Nitisol sans avoir le temps de diffuser dans le gel du dispositif DGT) ou de conditions hydrodynamiques qui empêchent la diffusion.

Premièrement, pour les deux sols, les valeurs de pH et d'activité microbienne totale sont proches et leurs évolutions concordantes. Ces paramètres ne permettent donc pas d'expliquer les différences observées. Comme discuté précédemment, même si l'activité microbienne totale est la même, une famille de microorganismes spécifique peut être plus active dans un sol que dans l'autre. En effet, il a été démontré que la composition des communautés bactérienne varie en fonction de la texture du sol (Gelsomino *et al.*, 1999; Fang *et al.*, 2005; Fang *et al.*, 2007). Par exemple, une famille de bactéries favorisant la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS pourrait être présente dans l'Arénosol et absente dans le Nitisol, et plus active en présence de nano-<sup>68</sup>ZnS, ce qui pourrait expliquer les variations de pH entre l'Arénosol + NP et l'Arénosol témoin. Cependant, les résultats disponibles de cette étude ne sont pas suffisants pour valider ou rejeter cette hypothèse. Par exemple, pour étudier plus en détails l'hypothèse (i), il serait intéressant de comparer le rapport  $\text{Fe}^{3+}/\text{Fe}^{2+}$  ainsi que son évolution dans le temps. En effet,  $\text{Fe}^{3+}$  est un oxydant qui pourrait favoriser la dissolution de nano-ZnS dans l'Arénosol par rapport au Nitisol (Heidel *et al.*, 2011).

La composition minéralogique du sol pourrait valider l'hypothèse (ii). En effet, de nombreuses études ont déjà montré la capacité des phyllosilicates et des oxydes de fer à adsorber le Zn (Scheinost *et al.*, 2002; Manceau *et al.*, 2004; Rieuwerts, 2007; Kumpiene *et al.*, 2008; Sipos *et al.*, 2008). En étudiant la spéciation du Zn dans le sol, ces études montrent que le Zn est principalement associé aux phyllosilicates et plus minoritairement aux oxydes de fer (10-20%). La gibbsite est également un ligand potentiel du Zn dont l'affinité dépend de la surface d'exposition (Roberts *et al.*, 2003). La comparaison des diffractogrammes des deux sols (Figure 2) montre que ces deux sols ont des compositions minéralogiques contrastées. L'Arénosol est principalement composé de Quartz. D'autres silicates ont été identifiés (muscovite, montmorillonite, kaolinite), mais probablement en faible quantité. Le Nitisol a une composition plus variée et contient des silicates communs avec l'Arénosol : quartz et kaolinite. Le Nitisol contient aussi d'autres silicates (Feldspath, Halloysite), des oxydes de fer (hématite, magnétite, goethite), oxydes de fer et de titane (ilménite) et oxydes d'aluminium (Gibbsite).

La CEC est un paramètre qui indique la charge disponible pour adsorber les cations et détermine ainsi le comportement potentiel des métaux dans le sol. La CEC dépend principalement de la teneur en argiles du sol et de la teneur de matière organique. Pour les phyllosilicates, la CEC est contrôlée par la substitution des ions  $\text{Al}^{3+}$  et  $\text{Si}^{4+}$  dans les couches tétraédriques ou octaédriques des phyllosilicates qui crée une charge négative, et du degré d'accessibilité aux espaces entre ces couches (Young, 2013). La CEC de l'Arénosol est plus faible ( $3.2 \text{ cmol}(+)/\text{kg}^{-1}$ ) que celle du Nitisol ( $10.6 \text{ cmol}(+)/\text{kg}^{-1}$ ), ce qui est cohérent avec la composition du Nitisol plus riche en phyllosilicates et en matière organique.

L'hypothèse (ii) pour expliquer la quantité plus importante de Zn labile issu des nano- $^{68}\text{ZnS}$  dans l'Arénosol considère que les composants du Nitisol ont une affinité plus forte pour le Zn que les composants de l'Arénosol. Premièrement, cela pourrait être expliqué par la CEC plus élevée dans le Nitisol qui permet de retenir plus facilement le Zn issu de la dissolution. De plus, les minéraux présents dans le Nitisol sont des phases porteuses du Zn souvent observées dans les sols (oxydes de fer et phyllosilicates). Ainsi, le Zn issu de la dissolution des nano- $^{68}\text{ZnS}$  pourrait être immédiatement immobilisé avant que le Zn ne diffuse dans le gel du dispositif DGT.

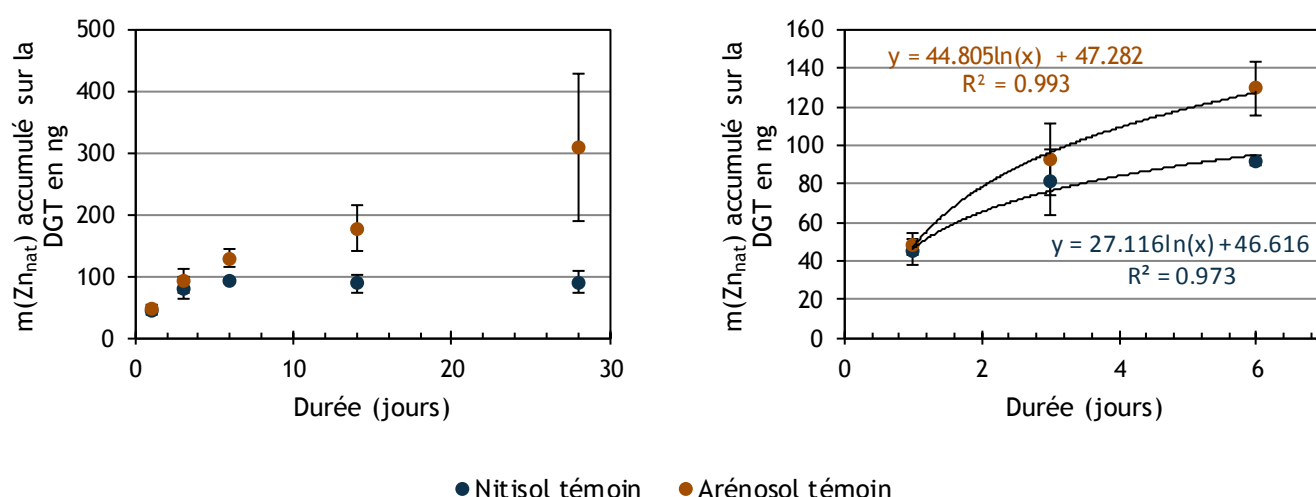


Figure 9 : Quantité de Zn naturel labile accumulé sur la DGT dans les deux sols témoins.

La Figure 9 présente l'évolution du Zn naturel labile dans les sols témoins sans nano- $\text{ZnS}$ . Pour le Nitisol, la tendance est similaire à l'évolution du Zn labile issu de la dissolution des nano- $^{68}\text{ZnS}$  (Figure 7a) cependant la quantité de Zn labile se stabilise plus rapidement, au bout du 6<sup>ème</sup> jour d'incubation. Au cours des 6 premiers jours, on observe plutôt une évolution logarithmique du Zn labile (Figure 9.b). Cette différence s'explique par la présence de Zn naturel disponible dès le début de l'incubation, tandis qu'il y a un délai pour le Zn issu de la dissolution des nano- $^{68}\text{ZnS}$ . Pour l'Arénosol, la quantité de Zn labile n'atteint pas de palier et continue d'augmenter après l'évolution de type logarithmique observée les 6 premiers jours. Ainsi, malgré la concentration en Zn total du sol beaucoup plus faible dans l'Arénosol ( $23 \text{ mg/kg}$ ) que dans le Nitisol ( $170 \text{ mg/kg}$ ), la quantité de Zn labile est significativement plus élevée dans l'Arénosol que dans le

Nitisol à partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation ( $p < 0.0001$ ). Ces résultats soutiennent l'hypothèse (ii) en montrant que les caractéristiques de l'Arénosol ne favorisent pas la rétention du Zn, contrairement au Nitisol.

De plus, les résultats sont différents de ce qui était observé dans la solution de sol car la concentration en Zn était plus élevée pour le Nitisol que pour l'Arénosol à partir du 14<sup>ème</sup> jour d'incubation (Figure 6). Cette différence s'explique par le fait que la fraction de Zn dosée dans la solution de sol est différente de la fraction accumulée sur la DGT. En effet, la DGT crée un gradient de diffusion dans le sol, ce qui diminue la concentration en Zn dans la solution de sol et engendre un réapprovisionnement provenant du pool de Zn disponible de la phase solide du sol : ce procédé est similaire à l'assimilation des ETM par les plantes. Ce pool de Zn n'est pas présent dans la solution de sol extraite par centrifugation. De plus, la solution de sol comprend des phases dissoutes telles que le Zn sous forme d'ion libre, de complexes organiques et inorganiques de taille  $< 0.2 \mu\text{m}$ , ainsi que sous forme associée aux colloïdes, qui peuvent être filtrés par la membrane à 3kDa de la nano-DGT. La différence observée entre les résultats de Zn sur la DGT (masse plus importante pour l'Arénosol) et dans la solution du sol (concentration plus importante pour le Nitisol) met en évidence l'importance de caractériser la quantité de Zn labile, plus représentatif du pool de Zn disponible. Cette différence peut être expliquée par deux hypothèses :

- Le gradient créé par la DGT provoque la désorption du Zn sur la phase solide de l'Arénosol mais n'est pas assez fort pour provoquer la désorption du Zn sur la phase solide du Nitisol. Cela pourrait expliquer pourquoi la quantité de Zn labile mesuré sur la DGT est supérieure pour l'Arénosol par rapport au Nitisol tandis que la concentration en Zn dans la solution de sol est supérieure pour le Nitisol par rapport à l'Arénosol. Les composants du Nitisol formeraient donc des liaisons plus stables avec le Zn que les composants de l'Arénosol, ce qui concorde avec l'hypothèse (ii) énoncée en début de paragraphe.
- Les formes de Zn présentes dans la solution du sol du Nitisol ne sont pas des formes labiles donc ne s'accumulent pas sur la DGT, contrairement aux formes du Zn présentes dans la solution de sol de l'Arénosol.

L'hypothèse (ii) est donc cohérente avec les observations faites même si des expérimentations supplémentaires seraient nécessaires pour la valider. Les résultats permettent de conclure que la disponibilité du Zn issu de la dissolution des NPs significativement plus importante dans l'Arénosol que dans le Nitisol. C'est ce paramètre qui nous permet d'établir le risque environnemental car la fraction disponible est la fraction potentiellement biodisponible et donc bioaccumulable et potentiellement toxique. La fraction disponible, qui alimente la fraction de Zn labile mesurée par la DGT, représente également la fraction de Zn potentiellement lessivable et donc susceptible de contaminer les eaux souterraines. Ainsi, le risque lié à la dissémination des nano-ZnS lors de l'épandage des digestats est moindre sur un sol contenant des argiles et des oxydes de

fer et d'aluminium que dans un sol sableux. En effet, c'est la composition du sol qui contrôle le devenir des nano-ZnS, bien que les mécanismes ne soient pas encore validés. De plus, les résultats montrent que la dissolution des nano-ZnS a lieu dès les premières 24 heures de contact. Cependant, si la labilité du Zn est relativement faible et stable dans le Nitisol sur des temps courts (28 jours) grâce à l'adsorption par les minéraux du sol (hypothèse ii), des variations physico-chimiques, comme une baisse de pH, dans le sol pourraient engendrer la désorption du Zn (Dzombak et Morel, 1990).

Le transport des solutés dans le sol dépend de la conductivité hydraulique, c'est-à-dire la perméabilité du sol (Zelege et Si, 2005). Ce paramètre est difficile à évaluer car il dépend par exemple de la distribution de tailles des pores, de leur connectivité, de leur tortuosité (Vervoort et Cattle, 2003), ce qui nécessiterait une caractérisation par imagerie 3D des deux sols. Aksu *et al.* (2015) ont montré avec des grains de quartz enrobés de kaolinite que plus le taux de kaolinite augmente et plus la perméabilité des échantillons diminue. Puis, dans des solides moins poreux (porosité < 40%), le gonflement de la montmorillonite diminue également la perméabilité des solides. Cela peut être expliqué car la tortuosité du sol diminue lorsque la quantité d'eau augmente dans le sol (Hooda *et al.*, 1999), or les molécules d'eau qui se fixent entre les feuillets des argiles gonflantes ne participent pas à diminuer la tortuosité du réseau de pores. Rigoureusement, nous ne pouvons pas comparer quantitativement la quantité d'argiles des deux sols. Cependant, par comparaison des intensités des pics de diffractions, le Nitisol est potentiellement plus riche en argiles (Kaolinite, Halloysite, Feldspath) que l'Arénosol, ce qui concorderait avec une diffusion limitée du Zn issu de la dissolution des nano-ZnS dans le Nitisol. D'autres études exposent que lorsque la porosité du sol augmente, la tortuosité du réseau de pores diminue (Vervoort et Cattle, 2003) et que la taille, forme et orientations des grains par rapport au débit de fluide et la minéralogie influencent également la tortuosité d'un milieu poreux (Salem et Chilingarian, 2000). Finalement, différents paramètres contrôlent la perméabilité du sol et il n'est pas possible de conclure sur ce paramètre avec les informations dont nous disposons actuellement sur ces deux sols. Il n'est donc pas possible d'expliquer les différences de quantité de Zn labile par les différences de perméabilité des sols, mais cette hypothèse ne peut pas être rejetée.

La quantité de Zn provenant du traceur est de 10mg/kg<sub>sol</sub>, ce qui représente 5 % du Zn total (Zn naturel + Zn du traceur) du Nitisol ([Zn<sub>nat</sub>] = 170 mg/kg) et 30 % du Zn total de l'Arénosol ([Zn<sub>nat</sub>] = 23 mg/kg) après apport des nano-<sup>68</sup>ZnS. Le Tableau 4 présente la masse de Zn provenant du traceur (issu de la dissolution des nano-<sup>68</sup>ZnS) et la masse de Zn naturel (provenant du sol) + Zn provenant du traceur, accumulées sur la DGT au dernier jour de l'incubation, ce qui permet de déterminer la proportion de Zn labile total qui provient de la dissolution des nano-ZnS (%Zn<sub>tr</sub>) :

$$\%Zn_{tr} = m(Zn_{tr}) / (m(Zn_{tr}) + m(Zn_{nat})) * 100$$

Tableau 4 : masse de Zn du traceur et la masse de Zn naturel + Zn du traceur accumulées sur la DGT au dernier jour de l'incubation et la proportion de Zn provenant du traceur par rapport au Zn labile total au dernier jour d'incubation

Sol	Réplicat	m(Zn <sub>tr</sub> ) en ng	m(Zn <sub>nat</sub> ) + m(Zn <sub>tr</sub> ) en ng	%Zn <sub>tr</sub>
Nitisol	1	99	190	53
	2	224	431	52
	3	184	391	47
	4	89	185	48
	Moyenne			<b>50</b>
	Ecart-type			<b>3</b>
Arénosol	1	1622	2131	76
	2	1413	1871	76
	3	741	1016	73
	4	1733	2308	75
	Moyenne			<b>75</b>
	Ecart-type			<b>1</b>

La proportion de Zn labile provenant de la dissolution des nano-ZnS à la fin de l'incubation est en moyenne de 50 +/- 3 % pour le Nitisol et de 75 +/- 1% pour l'Arénosol. Ces résultats montrent que plus de la moitié du Zn labile provient de l'apport des nano-ZnS dans chacun des sols. De plus, cette proportion de Zn labile provenant du traceur est plus importante que la proportion de Zn du traceur apporté au sol par rapport au Zn total du sol (5 et 30 %, respectivement pour le Nitisol et l'Arénosol). Cela signifie que le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS est plus labile que le Zn naturellement présent dans le sol. La proportion de Zn labile provenant du traceur pourrait augmenter avec des apports répétés de nano-ZnS. Cependant, l'apport de nano-ZnS lié au recyclage des digestats s'accompagne également d'un apport de phases pouvant retenir le Zn : la matière organique et les oxydes de fer qui composent le PRO. En effet, Mamindy-Pajany *et al.* (2014) montrent que le Zn est principalement présent sous forme associée à la matière organique ou sorbé aux oxydes de fer amorphes dans un sol calcaire amendé par un PRO. Tella *et al.* (2016) montrent que la disponibilité du Zn dans un sol est corrélée avec la proportion de Zn sorbé aux oxydes de fer dans les PRO étudiés. Les auteurs suggèrent que la minéralisation de la matière organique des PRO qui entraîne une acidification du milieu serait à l'origine de la désorption du Zn lié aux oxydes de fer. Ainsi, les oxydes de fer présents dans les PRO ne sont pas forcément une phase porteuse qui assure la rétention du Zn dans un sol sur le long terme.

Les résultats que nous venons de discuter montrent que l'exposition du Zn issu de la dissolution varie significativement en fonction de la composition du sol. L'exposition au Zn labile, forme pouvant être toxique, est significativement plus importante dans un sol

sableux que dans un sol argileux après un apport de nano-ZnS. Nous venons donc de montrer qu'il est crucial de considérer les caractéristiques du sol amendé lors de l'évaluation du risque environnemental du recyclage des digestats contenant des nano-ZnS.

## References

- Aksu, I., Bazilevskaya, E., Karpyn, Z. (2015). Swelling of clay minerals in unconsolidated porous media and its impact on permeability. *GeoResJ*, 7, 1-13.
- Auffan, M., Rose, J., Bottero, J.-Y., Lowry, G. V., Jolivet, J.-P., Wiesner, M. R. (2009). Towards a definition of inorganic nanoparticles from an environmental, health and safety perspective. *Nature nanotechnology*, 4(10), 634-641.
- Chaudri, A. M., Allain, C. M. G., Barbosa-Jefferson, V. L., Nicholson, F. A., Chambers, B. J., McGrath, S. P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil*, 221(2), 167-179.
- Doelsch, E., Masion, A., Moussard, G., Chevassus-Rosset, C., Wojciechowicz, O. (2010). Impact of pig slurry and green waste compost application on heavy metal exchangeable fractions in tropical soils. *Geoderma*, 155(3-4), 390-400.
- Dzombak, D. A., Morel, F. M. M. (1990). *Surface Complexation Modeling: Hydrous Ferric Oxide*. New York: Wiley.
- Fang, M., Kremer, R. J., Motavalli, P. P., Davis, G. (2005). Bacterial diversity in rhizospheres of nontransgenic and transgenic corn. *Applied and environmental microbiology*, 71(7), 4132-4136.
- Fang, M., Motavalli, P. P., Kremer, R. J., Nelson, K. A. (2007). Assessing changes in soil microbial communities and carbon mineralization in Bt and non-Bt corn residue-amended soils. *Applied Soil Ecology*, 37(1-2), 150-160.
- Gelsomino, A., Keijzer-Wolters, A. C., Cacco, G., van Elsas, J. D. (1999). Assessment of bacterial community structure in soil by polymerase chain reaction and denaturing gradient gel electrophoresis. *Journal of Microbiological Methods*, 38(1-2), 1-15.
- Green, V. S., Stott, D. E., Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil biology and biochemistry*, 38(4), 693-701.
- Heidel, C., Tichomirowa, M., Breitkopf, C. (2011). Sphalerite oxidation pathways detected by oxygen and sulfur isotope studies. *Applied geochemistry*, 26(12), 2247-2259.
- Hooda, P., Zhang, H., Davison, W., Edwards, A. (1999). Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT): soil moisture effects on its performance in soils. *European Journal of Soil Science*, 50(2), 285-294.
- Inselsbacher, E., Ripka, K., Klauauf, S., Fedosyenko, D., Hackl, E., Gorfer, M., Hood-Novotny, R., Von Wirén, N., Sessitsch, A., Zechmeister-Boltenstern, S. (2009). A cost-effective high-throughput microcosm system for studying nitrogen dynamics at the plant-microbe-soil interface. *Plant and Soil*, 317(1-2), 293-307.
- Kirkham, M. B. (2014). Field Capacity, Wilting Point, Available Water, and the Nonlimiting Water Range. In M. B. Kirkham (Ed.), *Principles of Soil and Plant Water Relations* : Elsevier.
- Kopittke, P. M., Menzies, N. W., Wang, P., McKenna, B. A., Wehr, J. B., Lombi, E., Kinraide, T. B., Blamey, F. P. C. (2014). The rhizotoxicity of metal cations is related to their strength of binding to hard ligands. *Environmental toxicology and chemistry*, 33(2), 268-277.
- Kumpiene, J., Lagerkvist, A., Maurice, C. (2008). Stabilization of As, Cr, Cu, Pb and Zn in soil using amendments—a review. *Waste management*, 28(1), 215-225.

- Labud, V., Garcia, C., Hernandez, T. (2007). Effect of hydrocarbon pollution on the microbial properties of a sandy and a clay soil. *Chemosphere*, 66(10), 1863-1871.
- Mamindy-Pajany, Y., Sayen, S. p., Mosselmans, J. F. W., Guillon, E. (2014). Copper, nickel and zinc speciation in a biosolid-amended soil: pH adsorption edge,  $\mu$ -XRF and  $\mu$ -XANES investigations. *Environmental science & technology*, 48(13), 7237-7244.
- Manceau, A., Marcus, M. A., Tamura, N., Proux, O., Geoffroy, N., Lanson, B. (2004). Natural speciation of Zn at the micrometer scale in a clayey soil using X-ray fluorescence, absorption, and diffraction. *Geochimica et Cosmochimica Acta*, 68(11), 2467-2483.
- Mikha, M. M., Rice, C. W., Milliken, G. A. (2005). Carbon and nitrogen mineralization as affected by drying and wetting cycles. *Soil biology and biochemistry*, 37(2), 339-347.
- Pouran, H. M., Martin, F. L., Zhang, H. (2014). Measurement of ZnO nanoparticles using diffusive gradients in thin films: Binding and diffusional characteristics. *Analytical chemistry*, 86(12), 5906-5913.
- Rieuwerts, J. S. (2007). The mobility and bioavailability of trace metals in tropical soils: a review. *Chemical Speciation & Bioavailability*, 19(2), 75-85.
- Roberts, D. R., Ford, R. G., Sparks, D. L. (2003). Kinetics and mechanisms of Zn complexation on metal oxides using EXAFS spectroscopy. *Journal of Colloid and Interface Science*, 263(2), 364-376.
- Salem, H. S., Chilingarian, G. V. (2000). Influence of porosity and direction of flow on tortuosity in unconsolidated porous media. *Energy Sources*, 22(3), 207-213.
- Scheinost, A. C., Kretzschmar, R., Pfister, S., Roberts, D. R. (2002). Combining selective sequential extractions, X-ray absorption spectroscopy, and principal component analysis for quantitative zinc speciation in soil. *Environmental science & technology*, 36(23), 5021-5028.
- Sekine, R., Brunetti, G., Donner, E., Khaksar, M., Vasilev, K., Jämting, Å., Scheckel, K., Kappen, P., Zhang, H., Lombi, E. (2014). Speciation and lability of Ag-, AgCl-, and Ag<sub>2</sub>S-nanoparticles in soil determined by X-ray absorption spectroscopy and diffusive gradients in thin films. *Environmental science & technology*, 49(2), 897-905.
- Sipos, P., Németh, T., Kis, V. K., Mohai, I. (2008). Sorption of copper, zinc and lead on soil mineral phases. *Chemosphere*, 73(4), 461-469.
- Tella, M., Bravin, M. N., Thuriès, L., Cazevieuille, P., Chevassus-Rosset, C., Collin, B., Chaurand, P., Legros, S., Doelsch, E. (2016). Increased zinc and copper availability in organic waste amended soil potentially involving distinct release mechanisms. *Environmental Pollution*, 212, 299-306.
- Vervoort, R., Cattle, S. (2003). Linking hydraulic conductivity and tortuosity parameters to pore space geometry and pore-size distribution. *Journal of Hydrology*, 272(1-4), 36-49.
- WRB, I. W. G. (2015). *World Reference Base for Soil Resources 2014*
- Young, S. D. (2013). Chemistry of heavy metals and metalloids in soils *Heavy metals in soils* (pp. 51-95): Springer.
- Zelege, T. B., Si, B. C. (2005). Scaling relationships between saturated hydraulic conductivity and soil physical properties. *Soil Science Society of America Journal*, 69(6), 1691-1702.



## **Partie 2 : Devenir des nano-ZnS dans le sol à long terme et à l'échelle de la parcelle dans un sol argileux**

Les résultats de cette étude ont été publiés en 2017 dans la revue *Environmental Pollution* et sont présentés dans cette partie, en anglais, tels que soumis à la revue avant publication. Le but de cette étude était de déterminer le devenir du Zn d'un lisier de porc stocké dans une lagune anaérobie dans une parcelle de sol argileux, après 11 ans d'épandages répétés de lisier de porc. La spéciation du Zn a été déterminée par EXAFS au seuil K du Zn dans le lisier de porc, dans une parcelle de sol témoin et dans la parcelle de sol amendé. Les principaux résultats de cette étude sont :

- le Zn est présent à 100 % sous forme de nano-ZnS dans le lisier de porc. Cette caractérisation a été faite grâce à la série 1 de nano-ZnS nues présentée dans le chapitre 3 (résultats de caractérisation : partie 2.1.1. ). Ce résultat est en accord avec les tendances générales décrites dans le chapitre 2, c'est-à-dire que la phase nano-ZnS est une phase majoritaire du Zn dans les PRO qui ont une faible teneur en matière sèche,
- le Zn n'est pas présent sous forme de ZnS dans le sol amendé et se trouve sous forme liée aux oxydes de fer, argiles et matière organique. Ce résultat démontre la transformation rapide des nano-ZnS dans le sol, observée dans la partie 1, car le dernier épandage a eu lieu 6 mois avant la caractérisation.

## Radical change of Zn speciation in pig slurry amended soil: key role of nano-sized sulfide particles

Thiago Augusto Formentini <sup>a,c,\*</sup>, Samuel Legros <sup>b,h</sup>, Cristovão Vicente Scapulatempo  
Fernandes <sup>c</sup>, Adilson Pinheiro <sup>d</sup>, **Maureen Le Bars** <sup>e</sup>, Clément Levard <sup>e</sup>, Fábio Joel  
Kochem Mallmann <sup>f</sup>,  
Milton da Veiga <sup>g</sup>, Emmanuel Doelsch <sup>h</sup>.

<sup>a</sup> Department of Sanitary and Environmental Engineering, Federal University of Santa Maria (UFSM), 97105-900 Santa Maria, RS, Brazil

<sup>b</sup> CIRAD, UPR Recyclage et risque, 18524 Dakar, Senegal

<sup>c</sup> Department of Hydraulics and Sanitation, Federal University of Parana (UFPR), 81531-980 Curitiba, PR, Brazil

<sup>d</sup> Environmental Engineering Program, Regional University of Blumenau (FURB), 89030-000 Blumenau, SC, Brazil

<sup>e</sup> Aix Marseille Univ, CNRS, IRD, Coll France, CEREGE, Aix-en-Provence, France

<sup>f</sup> CAPES Foundation, Ministry of Education of Brazil, 70040-020 Brasilia, DF, Brazil

<sup>g</sup> UNOESC, P.O. Box 250, 89620-000, Campos Novos, SC, Brazil

<sup>h</sup> CIRAD, UPR Recyclage et risque, F-34398, Montpellier, France

\* Corresponding author (formentini@gmail.com)

### Abstract

Spreading livestock manure as fertilizer on farmlands is a widespread practice. It represents the major source of heavy metal(loid)s (HM) input in agricultural soils. Since zinc (Zn) is present at high concentrations in manure, it poses special environmental concerns related to phytotoxicity, groundwater contamination, and introduction in the food chain. Therefore, investigations on the fate and behavior of manure-borne Zn, when it enters the soil environment, are necessary to predict the environmental effects. Nevertheless, long-term field studies assessing Zn speciation in the organic waste matrix, as well as within the soil after manure application, are lacking. This study was designed to fill this gap. Using SEM-EDS and XAS analysis, we reported the following new results: (i) ZnS made up 100% of the Zn speciation in the pig slurry (the highest proportion of ZnS ever observed in organic waste); and (ii) ZnS aggregates were about 1- $\mu$ m diameter (the smallest particle size ever reported in pig slurry). Moreover, the pig slurry containing ZnS was spread on the soil over an 11-year period, totaling 22 applications, and the resulting Zn speciation within the amended soil was analyzed. Surprisingly, ZnS, i.e. the only species responsible for a nearly 2-fold increase in the Zn concentration within the amended soil, was not detected in this soil. Based on SEM-EDS and XAS observations, we put forward the hypothesis that Zn in the pig slurry consisted of nano-sized ZnS crystallites that further aggregated. The low stability of ZnS nanoparticles within oxic and

complex environments such as the studied soil was the key explanation for the radical change in pig slurry-borne Zn speciation after long-term amendments.

### LINE SUMMARY

Nano-sized ZnS particles accounted for 100% of the Zn speciation in the pig slurry (PS). PS-borne Zn underwent rapid conversion after spreading on the soil and was subsequently bound to soil minerals and OM.

**Keywords:** Trace elements; agricultural recycling; environmental impact; spectroscopy; microscopy.

## Introduction

There were nearly 1 billion pigs in the world in 2013. In the same year, China was the largest producer, with 475.9 million pigs, followed by the United States (64.8 million) and Brazil (36.7 million) (FAO, 2013). Pig manure is thus produced in massive quantities. In 2008, swine activity generated more than 900 million m<sup>3</sup> of pig slurry (PS) in the European Union alone (EC, 2014). Spreading manure as fertilizer on agricultural lands is the most common destination. Nevertheless, soil pollution by nitrate, phosphorus and heavy metal(loid)s (HM) has raised concern (Legros et al., 2013; Mallmann et al., 2012; Hernández et al., 2006). Whereas mobility and transfer mechanisms of the former have been substantially studied and are fairly well understood, the fate of exogenous HM in soils is still under ongoing investigation.

Zinc (Zn) is added to livestock feed owing to its growth and antibiotic attributes (Jondreville et al., 2003). However, most of this Zn is excreted in the manure and subsequently spread on the soil (Revy et al., 2003). Livestock manure currently represent 78% and 51% of total Zn inputs in agricultural soils in France and China, respectively. In China, Zn concentrations in pig manure have nevertheless increased about sixfold from the early 1990s to 2003 (Romeo et al., 2014 and references therein). Increased Zn concentrations may lead to phytotoxicity, introduction in the food chain via accumulation in plant tissues and grains, or groundwater contamination through leaching (Lipoth and Schoenau, 2007; Gräber et al., 2005; L'Herroux et al., 1997).

HM speciation in wastes and waste-amended soils is a key factor in determining their mobility, bioavailability, and potential toxicity in the soil-water-plant system. Speciation

takes into account chemical and physical properties such as the element isotopic composition, oxidation state, coordination and molecular structure (Reeder et al., 2006). Therefore, speciation-based investigations of the fate of organic waste-borne Zn is necessary to better predict the environmental effects of this widespread recycling practice (Tella et al., 2016).

Sequential extraction methods are most used to assess Zn speciation. This approach has been applied to examine organic waste (L'herroux et al., 1997) and organically-amended soils, mostly using controlled bench scale and short-term conditions (Guan et al., 2011; Plekhanova, 2012; Qiao et al., 2003; Hseu, 2006). Only a few studies have involved long-term field experiments (L'Herroux et al., 1997; Asada et al., 2012; Girotto et al., 2010). Although sequential extractions are straightforward and easy-to-use, they have major shortcomings, such as incomplete dissolution of target phases and/or dissolution of non-target species (Doelsch et al., 2008). Therefore, the obtained fractions, and consequently the research findings and interpretation, depend on the chosen extraction procedure.

On the contrary, XAS is a powerful structural technique for direct determination of trace element speciation in complex samples. XAS has been used in a few studies to assess HM speciation within PS (Legros et al., 2010a; Legros et al., 2010b; Lin et al., 2013) and soils amended with both sewage (Kirpichtchikova et al., 2006) and biosolids (Mamindy-Pajany et al., 2014). Nevertheless, XAS studies to assess Zn speciation within soils after PS amendment via long-term field experiments are lacking.

The present study takes into account a unique combination of three approaches. We assessed Zn speciation: (i) in the PS matrix and within the soil that had received PS amendments; (ii) by using a combination of state-of-the-art physical techniques: X-ray powder diffraction (XRD), scanning electron microscopy with X-ray microanalysis (SEM-EDS), and XAS; (iii) in a long-term field experiment (11 years). We considered qualitative and quantitative characterization of each Zn species detected in the PS and within the soil to obtain a comprehensive description on Zn behavior throughout the waste recycling process, from slurry storage until its fate within the soil after 11 years of land application.

## **1. Materials and methods**

### **1.1. Field experiment and soil characterization**

The experiment was conducted in the demonstration field of the *Cooperativa Regional Agropecuária de Campos Novos* (Copercampos), in Campos Novos, Santa Catarina State, southern Brazil. The basaltic soil is classified as Rhodic Hapludox (USDA, 2014), composed of 67.8% clay, 30.8% silt and 1.4% sand (Mallmann, 2013).

Pig slurry had been spread in field plots at different application rates since the year 2000. A control soil was also monitored, with soil characteristics and crop management identical to those of the PS-amended soil, except for the absence of PS application. For the present study, the control soil and the soil that had received the highest PS application rate –  $200 \text{ m}^3 \text{ ha}^{-1} \text{ year}^{-1}$  – were selected for analysis, in order to provide the most marked contrast in Zn concentration between treatments. Moreover, we recently demonstrated that most of the Zn added to the soil via PS amendment had accumulated in the soil surface horizon (Formentini et al., 2015). Samples from the 0–5 cm soil layer were therefore used in the present study. Sampling was performed in June of 2011, after 11 years of soil amendment and 22 PS applications (two per year). Details on the soil characterization, crop rotation, seeding, sampling and Zn concentration through the soil profile may be found elsewhere (Formentini et al., 2015; Mallmann, 2013; Veiga et al., 2012).

## **1.2. XRD analysis**

The mineral composition of the soil was identified with an X-ray diffractometer (X'Pert Pro, Panalytical) running at 40 kV and 40 mA, using Co K $\alpha$  radiation ( $\lambda=1.79 \text{ \AA}$ ) with a linear detector (X'Celerator) and a secondary flat monochromator. Samples were ground in an agate mortar and placed on zero background silicon sample holders with a few drops of ethanol. A counting time of 5.5 s per  $0.033^\circ$  step was used for  $2\theta$  in the  $4\text{--}80^\circ$  range. Phase identification was performed using XRD data analysis software (X'pert PRO Highscore plus) and its powder diffraction database (ICDD-PDF2).

## **1.3. Pig slurry characterization**

Pig slurry was obtained from an anaerobic lagoon reservoir located on a pig finishing farm in Campos Novos, Brazil. The average physico-chemical characteristics of the PS added to the soil during the experiment were: 7.3 pH, 2.25% dry mass content, and  $43.0 \text{ g m}^{-3}$  of Zn (Formentini et al., 2015). For the present study, a fresh PS sample was collected from the same anaerobic lagoon reservoir that had provided the samples used in the soil amendments. One portion of this sample was subjected to a size fractionation procedure, and fractions were dried to assess the dry matter content and Zn concentration in each fraction (Section 1.4). Another portion was subjected to the same particle size fractionation procedure, except that the obtained fractions were not dried and were used in liquid form for SEM–EDS analysis (Section 1.5). Finally, another portion of raw PS was freeze-dried ( $-53^\circ\text{C}$ ), ground with a mortar and pestle, and pressed into pellets for powder EXAFS analysis, along with the soil samples (Section 1.6). The anaerobic conditions in the sample were preserved by collecting it near the bottom of the lagoon, with storage in a sealed plastic container without air bubbles, in the dark at  $4^\circ\text{C}$  prior to analysis.

## 1.4. Particle size fractionation of pig slurry

Filtration thresholds of 20  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$  and 10 kDa were used, leading to four particle size fractions: >20  $\mu\text{m}$ , 20–0.2  $\mu\text{m}$ , 0.2  $\mu\text{m}$ –10 kDa, and <10 kDa. Forty grams of liquid raw PS were passed through a 20  $\mu\text{m}$  nylon net filter (Whatman). The retained solid fraction was dried (60°C, 48 h) and weighed, and it represented the >20  $\mu\text{m}$  fraction. The filtrate was subjected to tangential flow filtration. The filtration system (KrosFlo, Spectrum Laboratories Inc.) was mounted with a 0.2- $\mu\text{m}$  pore size modified polyethersulfone (mPES) hollow filter and fed at 10 ml min<sup>-1</sup>. The system was adjusted for a filtration flow of 1 ml min<sup>-1</sup> (10% of the feeding flow) to allow sample recirculation. The permeate end was then closed and the system was fed with 10 ml of demineralized water for recirculation in order to recover the retentate containing the 20–0.2  $\mu\text{m}$ -size fraction. This retentate was dried and weighed. The permeate was then passed through a 10-kDa pore size mPES hollow filter, which was mounted on the same filtration system, as a replacement for the previous filter. The same filtration procedure was conducted and the retentate containing particles in the 0.2  $\mu\text{m}$ –10 kDa range was collected, dried and weighed. Lastly, the permeate containing the <10 kDa fraction (virtually lacking solid particles) was collected, acidified and stored prior to analysis.

The >20  $\mu\text{m}$  fraction was not further analyzed due to its low (and insufficient) mass recovery, i.e. below 2% of the PS dry matter. Dried samples of the raw PS (10 g of liquid raw sample were dried at 60°C for 48 h) and the 20–0.2  $\mu\text{m}$  and 0.2  $\mu\text{m}$ –10 kDa fractions were subjected to acid digestion according to the EPA 3051A protocol (USEPA, 2007). The digested samples and the <10 kDa fraction were analyzed for their Zn concentrations using ICP-MS (NexION 300X, PerkinElmer).

## 1.5. SEM-EDS analysis of the pig slurry

Liquid samples of the 20–0.2  $\mu\text{m}$  particle-size fraction (filtered as described in Section 1.4) were analyzed using SEM–EDS. This fraction was selected because it contained most of the dry matter and Zn content (see Section 2.2). A small portion of sample was sonicated gently and a droplet was deposited onto a holey-carbon-coated 200 mesh Cu-TEM grid. The sample was allowed to dry on the grid for a few hours prior to analysis. The scanning electron microscope (Philips XL30 SFEG, North Billerica, MA) was operated at 15 kV accelerating voltage with a counting time of 60 s per point. Elemental analysis was performed with an energy dispersive spectrometer (Oxford Instruments, Oxfordshire, UK).

## 1.6. EXAFS

Zinc K-edge X-ray absorption spectra of the PS and soil samples were recorded on the FAME beamline at the ESRF, Grenoble, France. Finely ground samples were pressed into pellets and analyzed at liquid He temperature to prevent sample damage by photoreduction. The signal was acquired in fluorescence mode using a 30 element solid-

state Ge detector (CANBERRA Industries Inc.). The spectra were the sum of 5 to 16 scans, depending on the Zn concentration and the noise level.  $E_0$  was set at 9664.6 eV for normalization and extraction of EXAFS spectra. Normalization and data reduction were performed according to standard methods (Doelsch et al., 2006) using Athena software (Ravel and Newville, 2005).

Previously background subtracted and normalized EXAFS spectra were subject to a least-square linear combination fitting (LCF) procedure over the  $k$ -range 2–9.9 Å<sup>-1</sup>. A library of Zn model compounds was used to identify and quantify the Zn-bearing components in the samples. The residual parameter [ $Res = \Sigma (k^2 \chi_{exp} - k^2 \chi_{model})^2 / \Sigma (k^2 \chi_{exp})^2$ ] and visual analysis of the fits were used as the fit criterion. LCF scenarios using only one and up to five fitting components were successively tested and evaluated based on the  $Res$  value and by visual observation of the quality and improvement of LCF when adding an extra component to previous best fits. LCFs with  $n + 1$  components were retained if the  $Res$  parameter was decreased by more than 20% as compared to the fit with  $n$  components.

The sum of component weights in the best LCFs ranged from 90% to 112%. Deviations from 100% may arise from variations in amplitudes due to overabsorption during spectra recording or from slight differences between the structure of Zn species existing in the samples and in the reference materials (Jacquat et al., 2009a; Manceau et al., 2002). Linear combination results were normalized to 100% for the comparison of the relative speciation between samples.

The library of Zn model compounds included: (i) primary and secondary Zn minerals and precipitates, i.e. synthetic ZnS nanoparticles (see Section 1.7), bulk ZnS (Aldrich), willemite (Zn<sub>2</sub>SiO<sub>4</sub>), parahopeite [Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>•4(H<sub>2</sub>O)], zincite (ZnO), franklinite (ZnFe<sub>2</sub>O<sub>4</sub>), zinc hydroxide [Zn(OH)<sub>2</sub>], smithsonite (ZnCO<sub>3</sub>), zinc sulphate (ZnSO<sub>4</sub>), zinc phosphate [Zn<sub>3</sub>(PO<sub>4</sub>)<sub>2</sub>], zinc nitrate [Zn(NO<sub>3</sub>)<sub>2</sub>] and zinc aluminate (ZnAl<sub>2</sub>O<sub>4</sub>); (ii) mineral surface sorption complexes at different loadings, i.e. Zn-HIM (hydroxy-interlayered mineral), Zn sorbed kaolinite, Zn sorbed ferrihydrite, Zn sorbed goethite, Zn sorbed birnessite, Zn sorbed kerolite, Zn-LDH (layered double hydroxide) and Zn sorbed hydrotalcite; and (iii) Zn-organic complexes: Zn-malate, Zn-cysteine, Zn-acetate, Zn-citrate, Zn-phytate, Zn-oxalate, Zn-malate, Zn-methionine, Zn-histidine, Zn-phthalocyanine, Zn-glycine, Zn-galacturonic acid and Zn-pectin. For convenience, only the spectra of model compounds used in the best LCF scenarios to simulate the PS and soil sample spectra were presented and discussed (Sections 2.2.2 and 2.3.2).

## 1.7. Synthesis and characterization of ZnS nanoparticles

ZnS nanoparticles were synthesized by mixing high purity ZnCl<sub>2</sub> and Na<sub>2</sub>S in N<sub>2</sub>-purged deionized water. The Zn<sup>2+</sup> concentration was set at 0.04 M, and different S<sup>2-</sup> concentrations were used in order to obtain ZnS particles of different sizes. Three S/Zn molar ratios were used: 0.9, 1.1 and 3.0. After precipitation, the ZnS suspensions were

aged for 48 h in the dark, at room temperature, with constant stirring. The final suspension pH levels were 3.6, 5.6 and 12.8, respectively. To remove excess salts, the suspensions were centrifuged at 3488 g for 30 min. The supernatant was then removed and the ZnS nanoparticles were dispersed in 20 mL of deionized water using an ultrasound bath and vortex. To exclude oxygen, the whole procedure was performed in a glovebox containing 100% N<sub>2</sub>.

One portion of each suspension was diluted and 7-μL drops were laid on a 400-mesh carbon film. Particle sizes were obtained after transmission electronic microscopy (TEM) characterization using a JEOL JEM-2010 microscope with a 200 keV field emission source. The ZnS particle sizes were 2.49±0.29 nm, 4.73±1.11 nm, and 5.92±0.64 nm, respectively for the initial S/Zn molar ratios of 0.9, 1.1 and 3.0 (Supporting Information). Hence, the synthesized ZnS nanoparticles are hereafter denoted ZnS<sub>[2.5nm]</sub>, ZnS<sub>[4.7nm]</sub>, and ZnS<sub>[5.9nm]</sub>.

Another portion of each suspension was freeze-dried and the resulting powder was used for XRD analysis and to prepare thin PVP-diluted pellets for XAS analysis. XRD characterization was performed on the beamline 11-ID-B of the Advanced Photon Source (APS) at the Argonne National Laboratory (Lemont, USA). XAS spectra were recorded on the FAME beamline at ESRF, Grenoble, France. The spectra were obtained by merging two scans performed in transmission mode at liquid He temperature.

## 2. Results and discussion

### 2.1. Zn enrichment within the soil due to PS application

Figure 1 presents the Zn concentration within the 0–5 cm layer of the control and the amended soils, as well as the amounts of Zn added to the soil via PS application. The Zn concentration in the control soil was 100.4 mg kg<sup>-1</sup>, corresponding to 51.7 kg ha<sup>-1</sup> (soil bulk density<sub>(0–5 cm)</sub> = 1.03 g cm<sup>-3</sup>; Mallmann, 2013). The amount of Zn added to the soil over 11 years of PS application, at 200 m<sup>3</sup> ha<sup>-1</sup> year<sup>-1</sup>, was 94.6 kg ha<sup>-1</sup>. If the whole amount of pedogenic and exogenous Zn were retained within the 0–5 cm layer of the amended soil, the expected Zn concentration would be 146.3 kg ha<sup>-1</sup>. However, the observed concentration corresponded to 96.9 kg ha<sup>-1</sup>. This means that the PS additions caused a nearly 2-fold increase in the Zn concentration within the 0–5 cm layer of the amended soil. Excess Zn accumulated in deeper layers, i.e. up to 30 cm (Mallmann, 2013; Formentini et al., 2015).



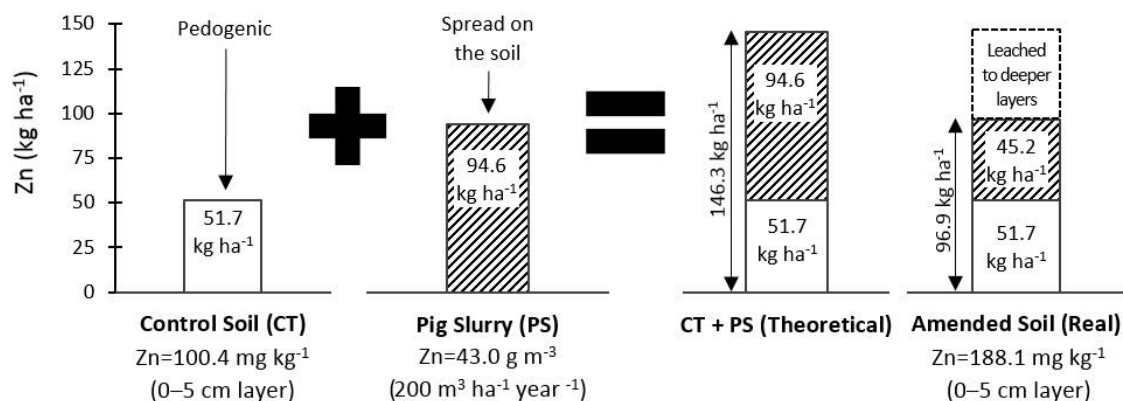


Figure 1 : Zn concentration within the 0–5 cm layer of the control and amended soils, as influenced by the amount of Zn added to the soil via PS (adapted from Mallmann, 2013 and Formentini et al., 2015).

## 2.2. Pig slurry

### 2.2.1. Co-location of Zn and S in sub-micron particle size

The PS dry matter was distributed as follows: 1.9% in the >20  $\mu\text{m}$  fraction, 74.6% in the 20–0.2  $\mu\text{m}$  fraction, and 17.9% in the 0.2  $\mu\text{m}$ –10 kDa fraction. The dry matter content in the <10 kDa fraction was negligible. The mass recovery of the size fractionation procedure was 94.4%. Assessment of the Zn concentration in the >20  $\mu\text{m}$  fraction was not possible, due to its low dry matter content. In the <10 kDa fraction, only the dissolved Zn concentration was measured (9.6  $\mu\text{g L}^{-1}$  of the fraction). The Zn concentration in the 20–0.2  $\mu\text{m}$  fraction was 708.6 mg kg<sup>-1</sup> of dry matter, accounting for 91.8% of the Zn in the PS. The Zn concentration in the 0.2  $\mu\text{m}$ –10 kDa fraction was 1.7 mg kg<sup>-1</sup> of dry matter, representing only 0.2% of the total Zn.

The preponderance of Zn in the 20–0.2  $\mu\text{m}$  fraction was in line with previous results. Legros et al. (2010a) reported 75% of Zn in the PS matrix in the 20–0.45  $\mu\text{m}$  size-fraction. Masse et al. (2005) found 80% of PS-Zn in the 10–0.45  $\mu\text{m}$  particle-size range.

Hence, the 20–0.2  $\mu\text{m}$  fraction was selected for SEM-EDS analysis. After extensive examination, the single region on the analyzed sample surface that contained Zn in the elemental composition was selected as presented in Figure 2. The diameter of the two detected particles was about 1  $\mu\text{m}$  (Figure 2b). It should be noted that the particles appeared to have a disordered long-range structure, especially particle #2. One possible explanation is that they consisted of micro-sized aggregates of smaller-(nano-)sized sub-units. Both contained mostly Zn and S in their elemental composition, but also low intensity peaks indicating the presence of Ca and K cations (Figure 2c). The co-location of Zn and S may be attributed to the presence of ZnS, which was previously observed in only one study (Legros et. al, 2010a). We conducted EXAFS analysis to test this hypothesis.

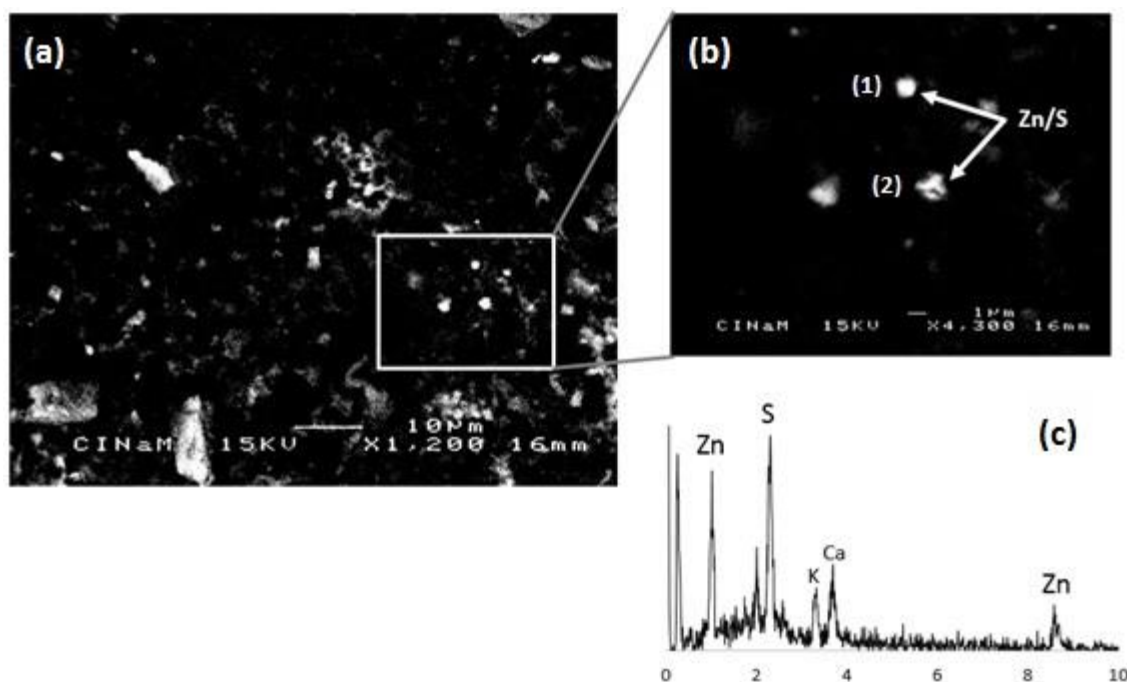


Figure 2 : (a, b) Scanning electron microscopy micrograph of the 20–0.2  $\mu\text{m}$  PS fraction; arrows indicate regions selected for energy dispersive X-ray spectroscopy (c).

### 2.2.2. Nano-sized ZnS particles in PS

The EXAFS spectra of the PS sample presented oscillation patterns in close agreement with the synthesized ZnS references. Figure 3a presents the EXAFS and Fourier transform (FT) spectra of the PS superposed by the spectra of the bulk (Aldrich) and the synthesized nano-ZnS with different particle sizes: ZnS<sub>[2.5nm]</sub>, ZnS<sub>[4.7nm]</sub>, and ZnS<sub>[5.9nm]</sub> (Section 1.7). The bulk ZnS spectrum was characterized by sharp and high amplitude EXAFS oscillations as compared to the PS sample and the nano-sized ZnS references. This was reflected in the FT spectra, in which the bulk ZnS displayed the highest intensity peaks. In bulk ZnS, the FT peak at 1.9 Å (not phase-shifted) indicated that the first Zn coordination shell was consisted of four S atoms located 2.34 Å from the central atom (Legros et al., 2010a). The FT peak centered at 3.7 Å originated from the Zn-Zn interaction in the second coordination shell, with a bonding distance of 3.87 Å and a coordination number of 12 (Roberts et al., 2002). Moreover, the second peak at 3.7 Å may have received a contribution from the Zn-S interaction in the third coordination shell.

The lower amplitude, sharpness (EXAFS) and intensity (FT) in spectra of the synthesized nano-ZnS references and the PS sample (compared to the bulk ZnS) may have been due to the greater proportion of under-coordinated Zn atoms located at the particle surfaces, causing a decrease in the average number of Zn neighbors. This is confirmed in the second FT peak (centered at 3.7 Å) in Figure 3a, in which the peak intensity declines with the ZnS particle-size.

The spectral features of the PS sample and the ZnS<sub>[4.7nm]</sub> reference presented the most pronounced similarity, both in the EXAFS and FT. This was confirmed by the LCF procedure. The best LCF for the PS sample was nearly perfectly adjusted to the sample spectra and was achieved by using only one component: ZnS<sub>[4.7nm]</sub> (Figure 3b).

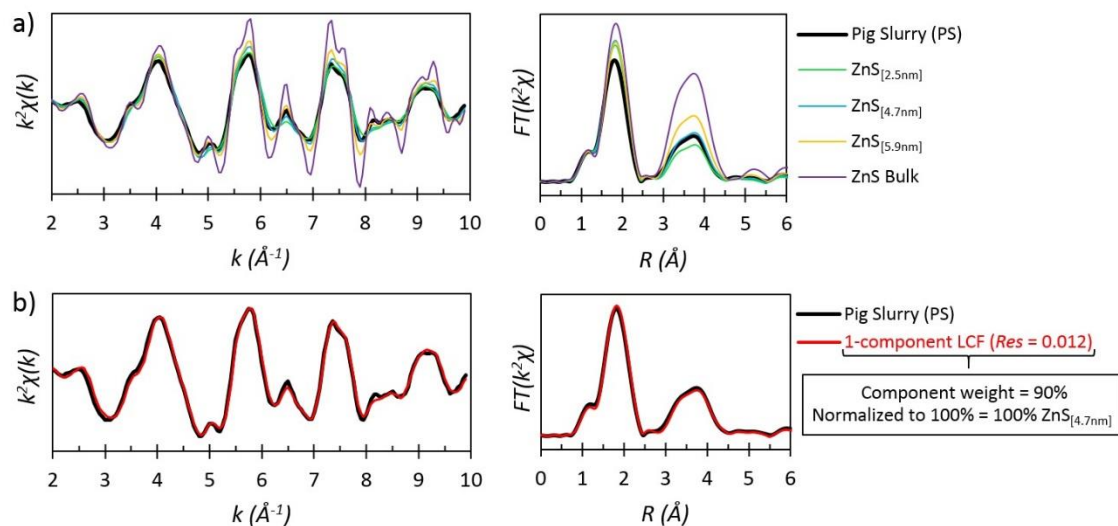


Figure 3 : (a)  $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the PS sample compared to bulk and nano-sized ZnS; (b) 1-component LCF for the PS sample.

Although EXAFS analysis may not be conclusive on particle-size determination, it may be assumed that the ZnS phase detected here in the PS had a relatively disordered structure compared to the bulk ZnS. We put forward the hypothesis that these ZnS particles were nano-sized. This is in agreement with our SEM-EDS analysis that showed the co-location of Zn and S in 1- $\mu\text{m}$  units that should have been formed by aggregation of nano-sized particles (Section 2.1.1; Figure 2). A very similar trend was recently observed in a sewage sludge product (Kim et al., 2014). The authors used TEM-based techniques to report ZnS nanocrystals with a 2.5–7.5 nm diameter range, forming aggregates of a few hundred nm. Moreover, in the latter study, the LCF of the sewage sludge spectra was consistent with the Zn local structure of a 3-nm ZnS reference material.

A few studies have been conducted on Zn speciation in PS, notably via sequential extractions. L'Herroux et al. (1997) reported a mixture of Zn bound to carbonate and Zn bound to oxides, whereas Miaomiao et al. (2009) found a mixture of Zn bound to oxides, Zn bound to organic matter (Zn-OM), and Zn in the residual fraction. Legros et al. (2010a), in a study involving combined SEM-EDS and XAS analysis, reported for the first time the presence of ZnS particles in the PS matrix, along with Zn-OM and amorphous Zn hydroxides. The ZnS contribution to Zn speciation was 14%, and particles were about 5- $\mu\text{m}$  diameter.

To our knowledge, the present study is the first: (i) in which ZnS accounted for 100% of the Zn speciation in the PS matrix, and (ii) to provide evidence that ZnS in the PS was nano-sized. The anoxic environment within PS lagoons is consistent with the formation

of Zn sulfides by two possible mechanisms: chemical precipitation or bacteria-assisted sulfate reduction (Legros et al., 2010a). We attribute our novel findings to the special care we took to preserve the sample anaerobic conditions during the sampling and storage procedures (Section 1.3). This was not the case for other studies in which samples were vigorously shaken (L'Herroux et al., 1997), collected from a forced-aeration treatment process (Miaomiao et al., 2009), or in which no specific care was taken concerning sample oxidation (Legros et al., 2010a). Note also that precipitation of nano-sized ZnS particles might be favored in PS because of the high amount of OM that likely prevents the growth of ZnS particles by sorbing on their surfaces.

Furthermore, the PS containing 100% ZnS was spread on the soil over an 11-year period, totaling 22 applications. The resulting Zn speciation within the amended soil, as compared to the control soil and the PS, was then explored via EXAFS and XRD analysis.

## 2.3. Soil

### 2.3.1. Clays dominate the soil mineralogy

The X-ray diffractogram of the bulk soil is shown in Figure 4. The soil mineralogy was dominated by the phyllosilicates vermiculite and kaolinite, the aluminum hydroxide gibbsite, the Fe oxide hematite, and quartz. Therefore, vermiculite, kaolinite and hematite species were logical candidates with respect to potentially bearing Zn and were considered in the EXAFS analysis of the soil.

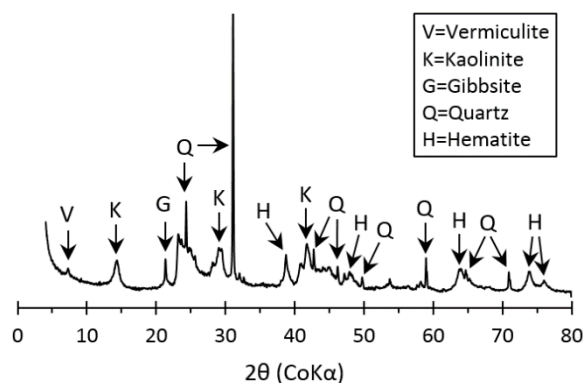


Figure 4 : X-ray diffractogram of the studied soil ( $\lambda=1.79\text{\AA}$ ).

### 2.3.2. ZnS was not detected in the amended soil

The  $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the control soil and the amended soil, as compared to Zn sorbed on the selected references, are shown in Figure 5. The references presented in Figure 5 were selected from the large database of Zn reference materials presented in Section 1.6 based on the most representative Zn species used in

the LCF procedure (to be presented in this section), while taking the soil composition into account (Section 2.3.1).

Both the control and amended soils displayed marked splitting in the first EXAFS oscillation, at  $3.75 \text{ \AA}^{-1}$  (dashed line “a”), coincident with the Zn-kaolinite reference. In this reference, splitting was due to the Zn-Al interaction in the second coordination shell, when Zn occupied dioctahedral vacancies in gibbsitic hydroxy-Al polymers. The Zn-Al interaction was reflected by the FT peaks at  $2.6 \text{ \AA}$  and  $5.5 \text{ \AA}$  (not phase-shifted, dashed lines “b” and “c”, respectively) (Jacquat et al., 2009a; Jacquat et al., 2009b; Schlegel & Manceau, 2007). Spectral signatures “a”, “b” and “c” were coincident in the soil samples and in the Zn-kaolinite reference, indicating that Zn-kaolinite may have dominated Zn speciation in the soil samples.

The spectra of Zn-ferrihydrite presented distinct oscillation patterns, reflecting the different Zn local environment in this Fe oxyhydroxide. The FT peak near  $1.5 \text{ \AA}$  (not phase-shifted, dashed line “d”) was slightly shifted to a shorter distance as compared to the Zn-kaolinite reference (dashed line “e”). Complexes on the ferrihydrite surface had Zn-O distances of around  $1.97 \text{ \AA}$  and coordination numbers consistent with tetrahedral oxygen, as opposed to Zn-O distances of around  $2.11 \text{ \AA}$  in octahedral coordination. Moreover, the FT peak at  $3.2 \text{ \AA}$  (not phase-shifted, dashed line “f”) arose from the Zn-Fe interaction in the second coordination shell, at  $3.44 \text{ \AA}$  distance (Waychunas et al., 2002). Therefore, Zn-ferrihydrite was used as a proxy to represent tetrahedrally coordinated adsorbed/complexed Zn on Fe (oxyhydr)oxides (Voegelin et al., 2011), denoted “Zn-Fe (oxyhydr)oxide” hereafter.

In the Zn-malate complex, the first Zn-O coordination shell was octahedral, and the second shell was composed of C and O atoms. Since Zn-malate is a common organic acid present in soils, it was used as LCF proxy to account for Zn bound to organic matter (Sarret et al., 2002; Jones et al., 1996), denoted “Zn-OM” hereafter.

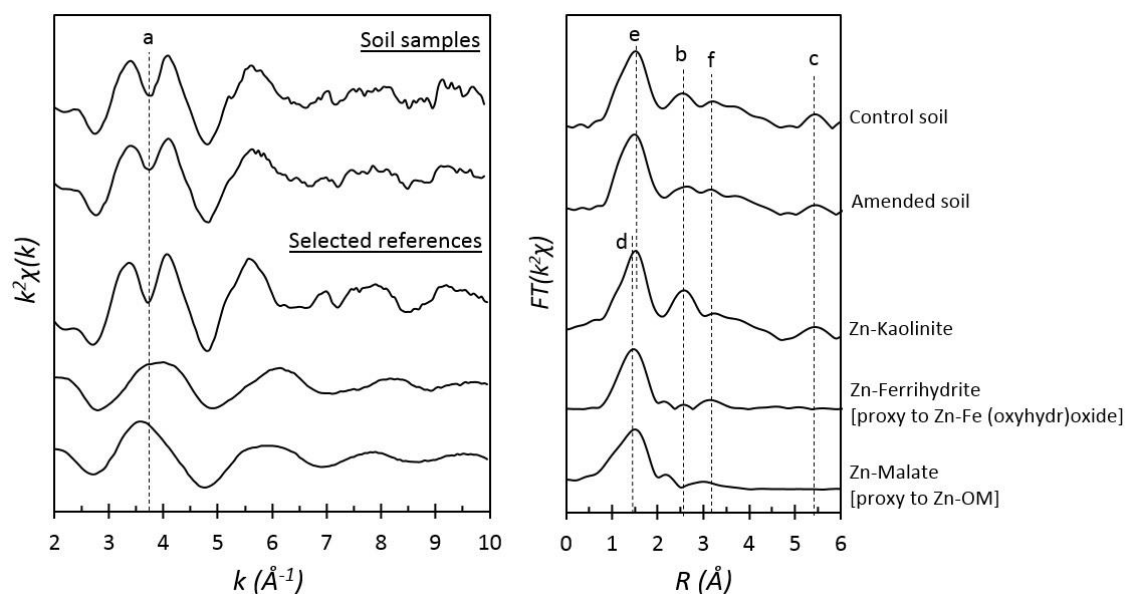


Figure 5 :  $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the control and amended soils as compared to the selected references.

The spectra of the control soil and the amended soil, superposed by their best LCF using the Zn reference database (Section 1.6), are shown in Figure 6. The best LCF for the control soil using two components used Zn-kaolinite and Zn-Fe (oxyhydr)oxide. Adding a third component (Zn-OM in the best fit) did not lead to a better reproduction of the sample spectra, and the decrease in the *Res* parameter was below 20%. Hence, the two-component LCF was the best solution. We attributed the contribution of the Zn-Fe (oxyhydr)oxide proxy reference to Zn-hematite, supported by the XRD observation of hematite in the soil composition (Section 2.1).

The LCF for the amended soil using two components was also achieved by combining the same references as in the control soil: Zn-kaolinite and Zn-Fe (oxyhydr)oxide. Nevertheless, adding a third component to the fit (Zn-OM) improved the reproduction of the sample EXAFS spectrum, notably in the first half of the main oscillation (pointing arrow “a”). Moreover, the resulting FT spectrum in the three-component scenario showed an increased amplitude in the first peak, followed by a decrease and a shift to a higher distance in the second peak as compared to the two-component scenario (pointing arrows “b” and “c”). The visual improvement in the quality of the LCF when adding the third component was confirmed by the more than 20% decrease in the *Res* parameter as compared to the two-component LCF. Hence, the three-component LCF was the optimal solution.

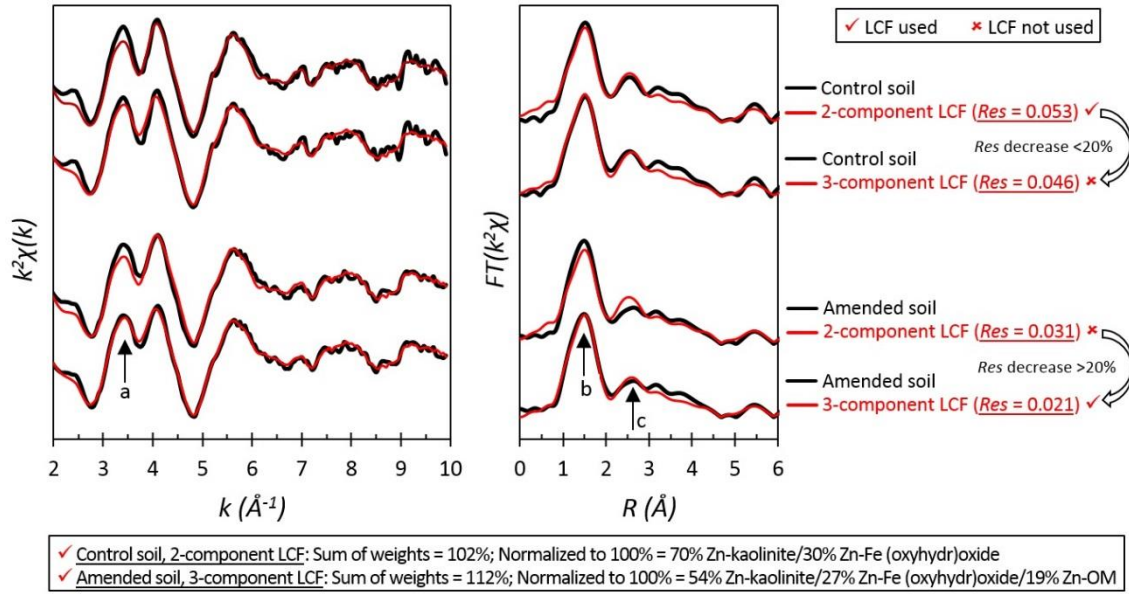


Figure 6 :  $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the control and amended soils, and the optimal LCF for each sample.

The resulting Zn speciations in the control soil, amended soil and PS are presented in Figure 7. The concentration of each Zn species within the soil samples was obtained by multiplying the normalized LCF proportions with the total Zn content in each soil (Section 2.1). The control soil ( $Zn = 100.4 \text{ mg kg}^{-1}$ ) contained 70% Zn-kaolinite ( $70.3 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and 30% Zn-Fe (oxyhydr)oxide ( $30.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ). The amended soil ( $Zn = 188.1 \text{ mg kg}^{-1}$ ) contained 54% Zn-kaolinite ( $101.6 \text{ mg kg}^{-1}$ ), 27% Zn-Fe (oxyhydr)oxide ( $50.8 \text{ mg kg}^{-1}$ ) and 19% Zn-OM ( $35.7 \text{ mg kg}^{-1}$ ).

Hence, Zn species originally present in the control soil [Zn-kaolinite and Zn-Fe (oxyhydr)oxide], plus Zn-OM (not detected in the control soil) were responsible for the assimilation of exogenous Zn, in the following proportions: 36% Zn-kaolinite, 23% Zn-Fe (oxyhydr)oxide and 41% Zn-OM. It should be stressed that the ZnS contained in the PS was the only exogenous source of Zn within the amended soil. It caused a Zn concentration increase from  $100.4 \text{ mg kg}^{-1}$  in the control soil to  $188.1 \text{ mg kg}^{-1}$  in the amended soil (0–5 cm layer; Figure 1). However, this species (ZnS) was not detected in the amended soil. Besides the LCF procedure, visual comparison between the spectral features of the ZnS-containing PS sample (Figure 3) and the amended soil (Figure 5) clearly confirmed the radical change in PS-borne Zn speciation after spreading on the soil. None of the EXAFS or FT spectral features coincided when comparing these two samples (PS vs amended soil). This rules out any possible underestimation or misinterpretation of the potential contribution of the PS-borne ZnS to Zn speciation in the amended soil.

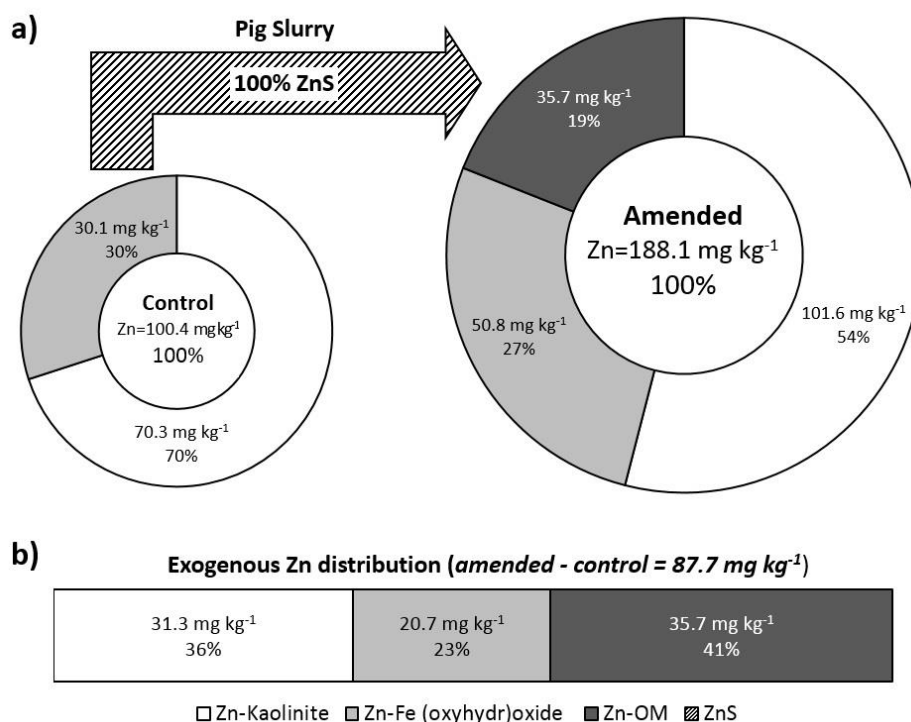


Figure 7 : (a) Zn speciation within the control and amended soils and the PS; and (b) the resulting exogenous Zn distribution.

## 2.4. Environmental implication

The solubility constant of sphalerite (i.e. ZnS) is  $2.93 \times 10^{-36}$  (Robert et al., 1988). It would therefore be expected to be highly insoluble, although the solubility may be influenced by the media composition, pH and redox conditions (Moreau et al., 2004; Martínez & Motto, 2000). Indeed, particulate transfer of micrometer-sized ZnS was the predominant mechanism of Zn propagation within the soil 18 months after spreading a ZnS-rich dredged sediment (Isaure et al., 2005). Nevertheless, the authors observed Zn leaching peaks when the oxidative dissolution of ZnS was favored by non-flooding conditions. Voegelin et al. (2011) reported 26% to 75% dissolution of 25–40-nm crystallite ZnS after 4 years of soil incubation. ZnS dissolution was slower in acidic soils, as compared to either a near neutral or a calcareous soil. Except for the calcareous soil, ZnS also dissolved more slowly compared to ZnO.

Moreover, reactivity of metal sulfides depends on the particle size, morphology, and crystal structure (Hochella et al., 2008; Liu et al., 2009), which may in turn be related to the formation process. The resistance of ZnS to re-oxidation was in the following order: sphalerite mineral > ZnS formed by SO<sub>4</sub>-reducing-bacteria > chemically precipitated ZnS (Peltier et al., 2011). The anoxic environment within PS lagoons is consistent with the formation of Zn sulfides by either bacteria-assisted sulfate reduction or chemical precipitation (Legros et al., 2010a). Indeed, the findings of full scale, pilot and benchtop



studies revealed that Zn sulfidation was dominant during anaerobic digestion of wastewater and in sewage sludge (Kim et al., 2014; Lombi et al., 2012; Ma et al., 2014).

Reducing the size of ZnS nanoparticles from 100 to 1 nm radius theoretically increased their solubility in water by five orders of magnitude (Moreau et al., 2004). Strain-driven distortion has been observed for small disordered ZnS nanoparticles (~3-nm), which could potentially reduce their stability (Gilbert et al. 2004), as for instance observed in submicrometer ZnS phases present in river suspended particulate matter when exposed to oxic environments (Priadi et al. 2012).

Therefore, the radical change in PS-borne Zn speciation following land application observed in this study was consistent with the presence of nano-sized ZnS particles in the PS matrix. This was supported by: (i) our SEM-EDS (Section 2.2.1) and XAS (Sections 2.2.2 and 2.3.2) observations; and (ii) by previous literature data (presented in this section), highlighting the influence of the particle size and structure, as well as the type of environment (e.g. oxic or anoxic), on the stability of such particles.

## Conclusion

In the present study, we: (i) identified, via SEM-EDS, aggregates of about 1- $\mu$ m diameter in the PS matrix, composed mostly of Zn and S; (ii) reported, using EXAFS, that ZnS accounted for 100% of the Zn speciation, most likely at the nano-scale, thus supporting our SEM-EDS observations; and (iii) verified that the Zn applied to the soil via PS spreading was not present in the form of ZnS, after 22 applications over 11 years, although this was the only source of Zn during the period.

Considering the nature of Zn added to the pig feed (sulfate), the nature of the lagoon used in the pig waste treatment (anoxic), and the results reported here, the most likely explanation for our findings is that: (i) dissolved Zn species reacted *in situ* with reduced S to form ZnS nanocrystals in the anaerobic lagoon; (ii) the formation process (chemical precipitation or bacteria-assisted sulfate reduction) and the nano-scale of the PS-borne ZnS favored the oxidation of this species within the soil, releasing Zn that was subsequently retained by phyllosilicates, Fe (oxyhydr)oxides and OM in the soil.

## Acknowledgements

The authors are grateful to Copercampos for authorizing this study in its experimental plots, and to Epagri for providing the soil samples. The authors also wish to thank Andreas Voegelin (Zn-kaolinite reference), Bernard Angeletti (ICP-MS assistance), Daniel Borschneck (XRD assistance), Nathan Bossa (PS filtration and SEM-EDS assistance),

Olivier Grauby (SEM-EDS assistance), Patrícia Dall' Agnol and Rafael Gotardo (PS sampling assistance). T.A. Formentini acknowledges CAPES for a postgraduate scholarship (99999.000142/2014-00) and UFSM for the leave of absence. This research used resources of the Advanced Photon Source, a U.S. Department of Energy (DOE) Office of Science User Facility operated for the DOE Office of Science by Argonne National Laboratory under Contract No. DE-AC02-06CH11357. We acknowledge the European Synchrotron Radiation Facility for provision of synchrotron radiation facilities and we would like to thank Isabelle Kiefer for assistance in using beamline BM30B.

## **Supporting information available**

TEM images and XRD characterization of synthesized ZnS nanoparticles used as reference materials for the EXAFS analysis of PS.

## References

- ASADA, K.; YABUSHITA, Y.; SAITO, H.; NISHIMURA, T. Effect of long-term swine-manure application on soil hydraulic properties and heavy metal behaviour. **European Journal of Soil Science**, v. 63, n. 3, p. 368–376, 2012.
- DOELSCH, E.; BASILE-DOELSCH, I.; ROSE, J. BORSCHNECK, D.; HAZEMANN, J. L.; MACARY, H. S.; BOTTERO, J. Y. New combination of EXAFS spectroscopy and density fractionation for the speciation of chromium within an andosol. **Environmental Science & Technology**, v. 40, n. 24, p. 7602–7608, 2006.
- DOELSCH, E.; MOUSSARD, G.; MACARY, H. S. Fractionation of tropical soilborne heavy metals – Comparison of two sequential extraction procedures. **Geoderma**, v. 143, n. 1-2, p. 168–179, 2008.
- EC – EUROPEAN COMMISSION. **Making the most of pig manure**. 2014. Available at: <<http://ec.europa.eu/programmes/horizon2020/en/news/making-most-pig-manure>>. Accessed 2015, June 15<sup>th</sup>.
- FAO – FOOD AND AGRICULTURE ORGANIZATION OF THE UNITED NATIONS. **Statistics Division: FAOSTAT**. 2013. Available at: <<http://faostat3.fao.org/home/E>> Accessed 2015, June 18<sup>th</sup>.
- FORMENTINI, T. A.; MALLMANN, F. J. K.; PINHEIRO, A.; FERNANDES, C. V. S.; BENDER, M. A.; VEIGA, M.; SANTOS, D. R.; DOELSCH, E. Copper and zinc accumulation and fractionation in a clayey Hapludox soil subject to long-term pig slurry application. **Science of the Total Environment**, v. 536, 831–839, 2015.
- GILBERT, B.; HUANG, F.; ZHANG, H.; WAYCHUNAS, G. A.; BANFIELD, J. F. Nanoparticles: strained and stiff. **Science**, v. 305, p. 651–654, 2004.
- GIROTTI, E.; CERETTA, C. A.; BRUNETTO, G.; SANTOS, D. S.; SILVA, L. S.; LOURENZI, C. R.; LORENSINI, F.; VIEIRA, R. C. B.; SCHMATZ, R. Acúmulo e formas de cobre e zinco no solo após aplicações sucessivas de dejetos líquidos de suínos. **Revista Brasileira de Ciências do Solo**, v. 34, n. 3, p. 955–965, 2010.
- GRÄBER, I.; HANSEN, J. F.; OLESEN, S. E.; PETERSEN, J.; ØSTERGAARD, H. S.; KROGH, L. Accumulation of Copper and Zinc in Danish Agricultural Soils in Intensive Pig Production Areas. **Danish Journal of Geography**, v. 105, p. 15–22, 2005.
- GUAN, T. X.; HE, H. B.; ZHANG, X. D.; BAI, Z. Cu fractions, mobility and bioavailability in soil-wheat system after Cu-enriched livestock manure applications. **Chemosphere**, v. 82, n. 2, p. 215–22, 2011.
- HERNÁNDEZ, D.; PLAZA, C.; SENESI, N.; POLO, A. Detection of copper(II) and zinc(II) binding to humic acids from pig slurry and amended soils by fluorescence spectroscopy. **Environmental Pollution**, v. 143, p. 212–220, 2006.
- HOCHELLA, M. F.; LOWER, S. K.; MAURICE, P. A.; PENN, R. L.; SAHAI, N.; SPARKS, D. L.; TWINING, B. S. Nanominerals, mineral nanoparticles, and earth systems. **Science**, v. 319, p. 1631–1635, 2008.
- HSEU, Z.-Y. Extractability and bioavailability of zinc over time in three tropical soils incubated with biosolids. **Chemosphere**, v. 63, n. 5, p. 762–771, 2006.
- ISAURE, M. P.; MANCEAU, A.; GEOFFROY, N.; LABOUDIGUE, A.; TAMURA, N.; MARCUS, M. A. Zinc mobility and speciation in soil covered by contaminated dredged sediment using micrometer-scale and bulk-averaging X-ray fluorescence, absorption and diffraction techniques. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 69, n. 5, p. 1173–1198, 2005.
- JACQUAT, O.; VOEGELIN, A.; KRETZSCHMAR, R. Local coordination of Zn in hydroxy-interlayered minerals and implications for Zn retention in soils. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, 348–363, 2009a.

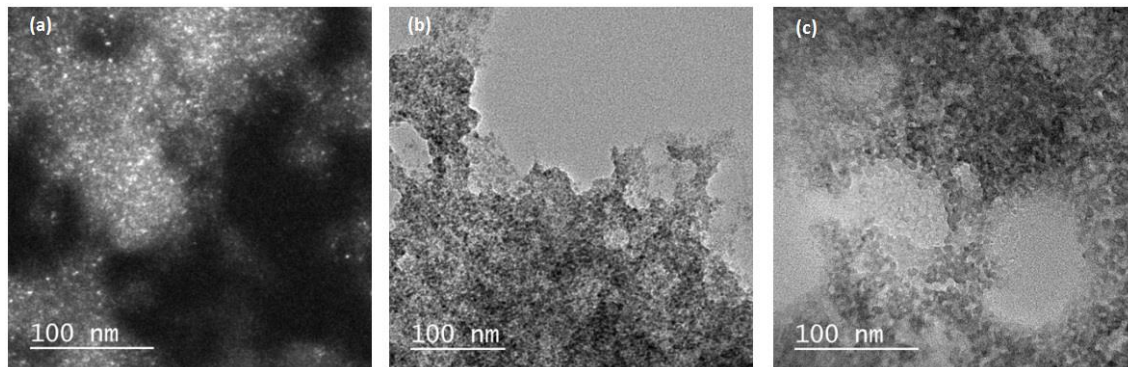
- JACQUAT, O.; VOEGELIN, A.; KRETZSCHMAR, R. Soil properties controlling Zn speciation and fractionation in contaminated soils. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 73, p. 5256–5272, 2009b.
- JONDREVILLE, C.; REVY, P. S.; DOURMAD, J. Y. Dietary means to better control the environmental impact of copper and zinc by pigs from weaning to slaughter. **Livestock Production Science**, v. 84, n. 2, p. 147–156, 2003.
- JONES, D. L.; PRABOWO, A. M.; KOCHIAN, L. V. Kinetics of malate transport and decomposition in acid soils and isolated bacterial populations: The effect of microorganisms on root exudation of malate under Al stress. **Plant and Soil**, v. 182, p. 239–247, 1996.
- KIM, B.; LEVARD, C.; MURAYAMA, M.; BROWN, G. E.; HOCELLA, M. F. Integrated approaches of x-ray absorption spectroscopic and electron microscopic techniques on zinc speciation and characterization in a final sewage sludge product. **Journal of Environmental Quality**, v. 43, p. 908–916, 2014.
- KIRPICHCHIKOVA, T. A.; MANCEAU, A.; SPADINI, L.; PANFILI, F.; MARCUS, M. A.; JACQUET, T. Speciation and solubility of heavy metals in contaminated soil using X-ray microfluorescence, EXAFS spectroscopy, chemical extraction, and thermodynamic modeling. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 70, p. 2163–2190, 2006.
- L'HERROUX, L.; LE ROUX, S.; APPRIOU, P.; MARTINEZ, J. Behaviour of metals following intensive pig slurry applications to a natural field treatment process in Brittany (France). **Environmental Pollution**, v. 97, n. 1, p. 119–130, 1997.
- LEGROS, S.; DOELSCH, E.; MASION, A.; ROSE, J.; BORSCHNECK, D.; PROUX, O.; HAZEMANN, J.-L.; SAINT-MACARY, H.; BOTTERO, J.-Y. Combining size fractionation, scanning electron microscopy, and X-ray absorption spectroscopy to probe zinc speciation in pig slurry. **Journal of Environmental Quality**, v. 39, n. 2, p. 531–540, 2010a.
- LEGROS, S.; CHAURAND, P.; ROSE, J.; MASION, A.; BRIOIS, V.; FERRASSE, J.-H.; MACARY, H. S.; BOTTERO, J.-Y.; DOELSCH, E. Investigation of copper speciation in pig slurry by a multitechnique approach. **Environmental Science & Technology**, v. 44, n. 18, p. 6926–6932, 2010b.
- LEGROS, S.; DOELSCH, E.; FEDER, F.; MOUSSARD, G.; SANSOULET, J.; GAUDET, J. P.; RIGAUD, S.; BASILE DOELSCH, I.; MACARY, H. S.; BOTTERO, J.-Y. Fate and behaviour of Cu and Zn from pig slurry spreading in a tropical water–soil–plant system. **Agriculture, Ecosystems & Environment**, v. 164, p. 70–79, 2013.
- LIN, Q.; LIANG, L.; WANG, L. H.; NI, Q. L.; YANG, K.; ZHANG, J.; CHEN, D. L.; YANG, J. J.; SHEN, X. D. Roles of pyrolysis on availability, species and distribution of Cu and Zn in the swine manure: chemical extractions and high-energy synchrotron analyses. **Chemosphere**, v. 93, p. 2094–2100, 2013.
- LIPOTH, S. L.; SCHOENAU, J. J. Copper, zinc, and cadmium accumulation in two prairie soils and crops as influenced by repeated applications of manure. **Journal of Plant Nutrition and Soil Science**, v. 170, n. 3, p. 378–386, 2007.
- LIU, J.; ARUGUETE D.; MURAYAMA M.; HOCELLA M. F. Influence of size and aggregation on the reactivity of an environmentally and industrially relevant nanomaterial (PbS). **Environmental Science & Technology**, v. 43, p. 8178–8183, 2009.
- LOMBI, E.; DONNER, E.; TAVAKKOLI, E.; TURNEY, T. W.; NAIDU, R.; MILLER, B. W.; SCHECKEL, K. G. Fate of zinc oxide nanoparticles during anaerobic digestion of wastewater and post-treatment processing of sewage sludge. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 9089–9096, 2012.
- MALLMANN, F. J. K. **Modelagem da transferência de cobre e zinco em solos contaminados por dejetos líquido de suínos**. 104 p. Ph.D. thesis (Doutorado em Ciência do Solo), Universidade Federal de Santa Maria, 2013.
- MALLMANN, F. J. K.; SANTOS, D. R. D.; CERETTA, C. A.; CELLA, C.; ŠIMŮNEK, J.; VAN OORT, F. Modeling field-scale vertical movement of zinc and copper in a pig slurry-amended soil in Brazil. **Journal of Hazardous Materials**, v. 243, p. 223–231, 2012.

- MAMINDY-PAJANY, Y.; SAYEN, S.; MOSSELMANS, J.F.; GUILLON, E. Copper, nickel and zinc speciation in a biosolid-amended soil: pH adsorption edge,  $\mu$ -XRF and  $\mu$ -XANES investigations. **Environmental Science & Technology**, v. 48, p. 7237–7244, 2014.
- MANCEAU, A.; MARCUS, M. A.; TAMURA N. Quantitative speciation of heavy metals in soils and sediments by synchrotron X-ray techniques. In: **Applications of Synchrotron Radiation in Low-temperature Geochemistry and Environmental Science**, v. 49. Washington, DC: Mineralogical Society of America, 2002.
- MARTINEZ, C. E.; MOTTO, H. L. Solubility of lead, zinc and copper added to mineral soils. **Environmental Pollution**, v. 107, p. 153–158, 2000.
- MASSE, L.; MASSE, D. I.; BEAUDETTE, V.; MUIR, M. Size distribution and composition of particles in raw and anaerobically digested swine manure. **Transactions of the ASAE**, v. 48, n. 5, p. 1943–1949, 2005.
- MIAOMIAO, H.; WENHONG, L.; XINQIANG, L.; DONGLEI, W.; GUANGMING, T. Effect of composting process on phytotoxicity and speciation of copper, zinc and lead in sewage sludge and swine manure. **Waste Management**, v. 29, p. 590–597, 2009.
- MOREAU, J. W.; WEBB, R. I.; BANFIELD, J. F. Ultrastructure, aggregation-state, and crystal growth of biogenic nanocrystalline sphalerite and wurtzite. **American Mineralogist**, v. 89, p. 950–960, 2004.
- PELTIER, E.; ILIPILLA, P.; FOWLE, D. Structure and reactivity of zinc sulfide precipitates formed in the presence of sulfate-reducing bacteria. **Applied Geochemistry**, v. 26, p. 1673–1680, 2011.
- PLEKHANOVA, I. O. Effect of wetting conditions on the fractional composition of heavy metal compounds in agrosoddy-podzolic soils contaminated with sewage sludge. **Eurasian Soil Science**, v. 45, n. 7, p. 657–664, 2012.
- PRIADI, C.; LE PAPE, P.; MORIN, G.; AYRAULT, S.; MAILLOT, F.; JUILLOT, F.; HOCHREUTENER, R.; LLORENS, I.; TESTEMALE, D.; PROUX, O.; BROWN, G. E. X-ray absorption fine structure evidence for amorphous zinc sulfide as a major zinc species in suspended matter from the Seine River downstream of Paris, Ile-de- France, France. **Environmental Science & Technology**, v. 46, p. 3712–3720, 2012.
- QIAO, X. L.; LUO, Y. M.; CHRSTIE, P.; WONG, M. H. Chemical speciation and extractability of Zn, Cu and Cd in two contrasting biosolids-amended clay soil. **Chemosphere**, v. 50, p. 823–829, 2003.
- RAVEL, B.; NEWVILLE, M. Athena, Artemis, Hephaestus: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. **Journal of Synchrotron Radiation**, v. 12, p. 537–541, 2005.
- REEDER, R. J.; SCHOONEN, M. A. A.; LANZIROTTI, A. Metal speciation and its role in bioaccessibility and bioavailability. **Reviews in Mineralogy and Geochemistry**, v. 64, p. 59–113, 2006.
- REVVY, P. S.; JONDREVILLE, C.; DOURMAD, J. Y.; NYS, Y. Le zinc dans l'alimentation du porc: Oligo-élément essentiel et risque potentiel pour l'environnement. **INRA Productions Animales**, v. 16, p. 3–18, 2003.
- ROBERTS, D. R.; SCHEINOST, A C.; SPARKS, D. L. Zinc speciation in a smelter-contaminated soil profile using bulk and microspectroscopic techniques. **Environmental Science & Technology**, v. 36, n. 8, p. 1742–1750, 2002.
- ROMEO, A.; VACCHINA, V.; LEGROS, S.; DOELSCH, E. Zinc fate in animal husbandry systems. **Metallomics**, v. 6, p. 1999–2009, 2014.
- SARRET, G.; SAUMITOU-LAPRADE, P.; BERT, V.; PROUX, O.; HAZEMANN, J. L.; TRAVERSE, A.; MARCUS, M. A.; MANCEAU A. Forms of zinc accumulated in the hyperaccumulator *Arabidopsis halleri*. **Plant Physiology**, v. 130, p. 1815–1826, 2002.
- SCHLEGEL, M. L.; MANCEAU, A. Zn incorporation in hydroxy-Al- and Keggin Al-13-intercalated montmorillonite: a powder and polarized EXAFS study. **Environmental Science & Technology**, v. 41, p. 1942–1948, 2007.
- TELLA, M.; BRAVIN, M. N.; THURIÈS, L.; CAZEVIEILLE, P.; CHEVASSUS-ROSSET, C.; COLLIN, B.; CHAURAND, P.; LEGROS, S.; DOELSCH, E. Increased zinc and copper availability in organic

- waste amended soil potentially involving distinct release mechanisms. **Environmental Pollution**, v. 212, p. 299–306, 2016.
- USDA – UNITED STATES DEPARTMENT OF AGRICULTURE. **Soil Survey Staff, Keys to Soil Taxonomy**. 12<sup>th</sup> ed. Washington: Natural Resources Conservation Service, USDA, 2014.
- USEPA – UNITED STATES ENVIRONMENTAL PROTECTION AGENCY. Method 3051A: Microwave assisted acid digestion of sediments, sludges, soils, and oils, In: **Sw-846 test methods for evaluating solid waste: physical/chemical methods**. Washington, 2007.
- VEIGA, M.; PANDOLFO, C. M.; JUNIOR, A. A. B.; SPAGNOLLO, E. Chemical attributes of a Hapludox soil after nine years of pig slurry application. **Pesquisa Agropecuária Brasileira**, v. 47, p. 1766–1773, 2012.
- VOEGELIN, A.; JACQUAT, O.; PFISTER, S.; BARMETTLER, K.; SCHEINOST, A. C.; KRETZSCHMAR, R. Time-dependent changes of zinc speciation in four soils contaminated with zincite or sphalerite. **Environmental Science & Technology**, v. 45, p. 255–261, 2011.
- WAYCHUNAS, G. A.; FULLER, C. C.; DAVIS, J. A. Surface complexation and precipitate geometry for aqueous Zn(II) sorption on ferrihydrite: I. X-ray absorption extended fine structure spectroscopy analysis. **Geochimica et Cosmochimica Acta**, v. 66, p. 1119-1137, 2002.

## Supporting Information.

SI-1) TEM images of synthesized ZnS nanoparticles.



- a) ZnS<sub>[2.5nm]</sub>: particle size =  $2.49 \pm 0.29$  nm; initial S/Zn molar ratio = 0.9; final pH of the suspension = 3.6.  
b) ZnS<sub>[4.7nm]</sub>: particle size =  $4.73 \pm 1.11$  nm; initial S/Zn molar ratio = 1.1; final pH of the suspension = 5.6.  
c) ZnS<sub>[5.9nm]</sub>: particle size =  $5.92 \pm 0.64$  nm; initial S/Zn molar ratio = 3.0; final pH of the suspension = 12.8.

## Conclusion

Ces études complémentaires permettent de faire une première conclusion sur le devenir des nano-ZnS dans le sol. Premièrement, ces deux études montrent la réactivité des nano-ZnS synthétisées ou formées dans un lisier de porc. Cette réactivité est illustrée à deux échelles spatio-temporelles par la dissolution qui a lieu dès 24h d'incubation et par l'absence, après 11 ans, de nano-ZnS dans le sol amendé tous les 6 mois avec un lisier de porc. L'équilibre est atteint plus rapidement dans un sol argileux (environ 15 jours) que dans un sol sableux (> 30 jours). De plus, le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS synthétisées est significativement plus disponible dans un sol sableux que dans un sol argileux sur une échelle temporelle de 30 jours. La dissolution des nano-ZnS est totale à l'échelle de la parcelle, mais la cinétique est difficile à établir précisément. A l'échelle de la parcelle, la totalité du Zn apporté par le lisier de porc (sous forme de nano-ZnS) est immobilisé dans la couche de surface 0-30 cm du sol argileux brésilien. Ce résultat est cohérent avec l'hypothèse (ii) énoncée dans la partie 1 qui considère que les nano-ZnS se dissolvent dans le Nitisol et que le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS est rapidement immobilisé par les composants du sol. En effet, des phases porteuses du Zn dans la couche 0-5 cm du sol argileux brésilien (oxydes de fer (probablement hématite), matière organique) sont présentes dans le Nitisol et absentes dans l'Arénosol. Ainsi, la présence de ces phases dans le Nitisol pourrait expliquer que le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS est moins disponible que dans l'Arénosol. La Kaolinite est aussi une phase porteuse du Zn dans le sol argileux brésilien qui est présente dans le Nitisol et l'Arénosol. Malgré l'aspect non quantitatif de la diffraction des rayons X, l'intensité de pics correspondant à la kaolinite dans l'Arénosol est faible et nous pouvons considérer la kaolinite en faible quantité dans l'Arénosol. La kaolinite pourrait donc également expliquer la rétention du Zn dans le Nitisol, comme cela a été observé dans le sol argileux brésilien. Une analyse semi-quantitative des phases minérales des deux sols est prévue afin de confirmer cette approximation. La combinaison de ces études a permis d'identifier certains composants du sol qui retiennent le Zn issu de la dissolution ce qui a pour conséquence de limiter l'exposition et donc le risque lié au Zn.

Cependant, il reste des questions qui nécessitent d'être étudiées pour prédire plus globalement le devenir du Zn. À court terme, il serait intéressant de savoir si la totalité des nano-ZnS s'est dissoute dans le sol sur une durée de 14 jours pour le Nitisol et de 30 jours pour l'Arénosol. La modélisation DIFS (DGT Induced Fluxes in Sediments and Soils) permet de quantifier deux pools de Zn labile : le Zn labile mobile (en solution) et le Zn labile immobile (sorbé) (Harper et al. 2000). Cette modélisation pourrait permettre de mieux quantifier le Zn labile dans le microcosme de sol à partir de la masse accumulée sur la résine de la DGT. Cette modélisation est donc prévue pour une meilleure compréhension de la dynamique des nano-ZnS dans le sol.



De plus, afin de pouvoir prédire le devenir du Zn après l'épandage de digestats ou de PRO contenant du Zn sous forme nano-ZnS, il est nécessaire de connaître plus précisément les composants du Nitisol capables d'immobiliser le Zn. Par exemple, l'influence des phyllosilicates n'est pas très claire car ces composés étaient présents dans les deux sols. Une étude plus mécanistique avec des compositions de sol différentes de celles que nous avons étudiées pourrait répondre à cette question. Par exemple, l'expérience d'incubation pourrait être répétée sur un plus grand nombre de sols avec différentes minéralogies en vue de tests de corrélation.

Si le devenir du Zn à long terme a été déterminé pour un sol argileux au Brésil, il est également fondamental de connaître l'influence des conditions météorologiques (e.g. fortes pluies) sur le devenir du Zn. De plus, pour une meilleure compréhension du devenir des nano-ZnS à long-terme, des informations manquent sur leur devenir pour des sols de différentes compositions. Par exemple, le devenir à long terme des nano-ZnS dans un sol sableux n'a pas été étudié et permettrait de quantifier la quantité de Zn lessivé et immobilisé dans le sol afin d'établir le risque environnemental.

Enfin, les résultats observés sur les systèmes simplifiés d'incubation de sols avec des nano-ZnS synthétisées pourraient être différents lors de l'apport de digestat. En effet, la matière organique peut changer les propriétés des nano-ZnS. Par exemple, nous avons vu dans le chapitre 4 que les molécules thiolées peuvent relâcher la contrainte des nano-ZnS, ce qui pourrait limiter leur dissolution. De plus, un enrobage organique autour des nano-ZnS pourrait les protéger de l'oxydation et ralentir leur dissolution. C'est pourquoi il est nécessaire de continuer cette étude à différentes échelles de complexité afin de mieux prédire le devenir des nano-ZnS présentes dans les digestats dans l'environnement.



## **Chapitre 5 - Conclusion générale et perspectives**



Etant donné la croissance de la population, la production de déchets est amenée à doubler d'ici 2025 (Hoornweg et Bhada-Tata, 2012). En France et ailleurs dans le monde, la méthanisation se développe comme solution de traitement et valorisation des PRO. Les digestats de méthanisation sont recyclés sur les sols agricoles. Sachant que les PRO ont des concentrations en zinc (Zn) importantes (Leclerc et Laurent, 2017), ce recyclage peut induire une accumulation importante de Zn dans les sols agricoles. Etant donné la toxicité potentielle du Zn (Chaudri *et al.*, 2000), il est indispensable d'étudier le risque environnemental lié au recyclage des digestats. Pour cela, la spéciation et la disponibilité du Zn sont des facteurs cruciaux à considérer car ils ont un impact sur l'exposition et la toxicité de ce contaminant (Nolan *et al.*, 2003).

Ainsi, la question générale de la thèse était la suivante :

**Quel est le devenir du Zn des PRO après méthanisation et recyclage agricole ?**

Si certaines études ont montré la présence de ZnS dans les digestats (Donner *et al.*, 2011; Lombi *et al.*, 2012; Kim *et al.*, 2014; Legros *et al.*, 2017), la proportion et la forme (nano/bulk) de ces ZnS varie entre ces études. De plus, il a été observé que les ZnS formés dans les PRO se transforment rapidement en conditions oxydantes (2 mois dans un PRO) (Lombi *et al.*, 2012) contrairement aux ZnS synthétiques (> 4 ans dans le sol) (Voegelin *et al.*, 2011). La taille nanoparticulaire, observée par Kim *et al.* (2014), pourrait expliquer cette réactivité. C'est pourquoi nous avons fait l'hypothèse que ce sont des nanoparticules de ZnS (nano-ZnS) qui se forment dans les PRO.

La thèse avait donc pour objectif de répondre à différentes questions majeures :

- Quel est l'impact de la méthanisation et des post-traitements des PRO sur la spéciation du Zn ? Notamment, les ZnS sont-ils présents sous forme de nanoparticules ?
- Quelles sont les caractéristiques structurales des nano-ZnS qui se forment dans un PRO ? Peuvent-elles influencer leur réactivité ?
- Quelle est l'influence des caractéristiques du sol sur la réactivité et le devenir des nano-ZnS ?

Les principaux résultats correspondant à chaque objectif sont repris et discutés avec des perspectives d'études qui permettraient de compléter les informations obtenues. Puis, l'implication des résultats de la thèse par rapport à la question générale sera discutée.

## **1. Evolution de la spéciation du zinc dans les PRO selon le traitement appliqué (méthanisation, compostage)**

Cette question a été traitée dans le Chapitre 2 et les résultats permettent d'établir une tendance générale à partir de PRO échantillonnés sur des sites en fonctionnement. Cette tendance générale n'avait pas pu être établie jusqu'à présent en raison des disparités (par ex. échantillonnage, modalité d'obtention des différents PRO-labo ou sites industriels) entre les études. L'échantillonnage d'une large collection de PRO a permis de montrer que :

- La concentration en Zn dans un PRO est déterminée par son origine : ce sont les PRO qui contiennent du lisier de porc ou des boues de STEP qui sont les plus concentrés en Zn.
- Le taux de Zn sous forme nano-ZnS dans un PRO brut dépend de sa teneur en matière sèche : la forme nano-ZnS est majoritaire (> 49%) pour les PRO bruts ayant un faible taux de matière sèche (<16%),
- La méthanisation favorise la précipitation de nano-ZnS dans les PRO, quel que soit les caractéristiques physico-chimiques et l'origine du PRO ; la phase nano-ZnS est donc la phase majoritaire du Zn (> 70%) dans les digestats,
- Ces nano-ZnS se transforment systématiquement lors du compostage (1-3 mois) ou du stockage de la fraction solide du digestat (< 1 mois) ; les phases observées dans les composts et digestats solides stockés en tas sont le Zn sous forme sorbée aux oxydes de fer, le phosphate de Zn amorphe et le Zn associée à la matière organique,

Lors de cette étude, nous avons pu réaliser l'importance des conditions d'échantillonnage et de manipulation des échantillons de PRO avant la détermination de la spéciation. En effet, malgré la lyophilisation des PRO, leur conservation à -20°C était nécessaire pour préserver la forme initialement présente (nano-ZnS).

Avec la technique de spectroscopie d'absorption des rayons X au seuil K du Zn, nous avons pu mettre en évidence que le signal EXAFS du PRO est similaire à celui de nano-ZnS synthétisées dont la taille est d'environ 3 nm. Ce résultat conforte notre hypothèse: les ZnS qui se forment dans les PRO ont une taille nanoparticulaire.

Cependant, ce résultat ne valide pas à 100% cette hypothèse. En effet, ce signal EXAFS pourrait également correspondre à des ZnS amorphes ou à un mélange de ZnS bien cristallisés et de ZnS amorphes. Afin de valider la taille des ZnS, une perspective de travail serait d'observer les ZnS des digestats par microscopie. Cependant, étant donné la matrice complexe du PRO et les concentrations en Zn proches des limites de détection en microscopie, cette approche n'est pas simple. D'éventuels prétraitements (filtration

tangentielle par exemple) de l'échantillon risqueraient de dissoudre les nano-ZnS. De plus, la microscopie ne permet pas d'avoir une information globale sur l'échantillon, c'est-à-dire que si nous parvenons à imager des nano-ZnS ou des ZnS amorphes, il se sera pas possible de généraliser à l'ensemble du PRO.

Finalement, les deux phases majoritaires dans l'ensemble des PRO sont les nano-ZnS, phase cristallisée sur des courtes distances et le phosphate de Zn amorphe, identifié pour la première fois dans les PRO. Ce résultat montre l'importance des phases amorphes dans les PRO, ce qui suggère une capacité de la matière organique à contrôler la cristallisation des phases minérales se formant dans le PRO. De même que nous avons caractériser la formation et le devenir des nano-ZnS, il est également nécessaire d'étudier la phase de phosphate de Zn amorphe.

Le traitement appliqué aux PRO a une influence majeure sur la spéciation du Zn. Sachant que la spéciation dans un PRO contrôle son devenir dans le sol (Tella *et al.*, 2016), ce résultat montre le choix du traitement du PRO pourra modifier le devenir du Zn lors du recyclage agricole de ce PRO. Cependant, le devenir dans le sol des phases identifiées dans le PRO (par ex. nano-ZnS, Phosphate de Zn amorphe) n'est pas connu. C'est pourquoi, il convient maintenant de s'interroger sur le devenir de ces formes chimiques de Zn dans le cadre de l'épandage d'un PRO.

## **2. Caractéristiques structurales des nano-ZnS en présence de molécules organiques**

Le chapitre 3 a consisté à répondre à la question principale de l'impact de la matière organique composant le PRO sur les caractéristiques structurales des nano-ZnS. Nous nous sommes notamment focalisés sur deux paramètres de structure qui peuvent avoir un impact sur la réactivité des nano-ZnS : la taille et la contrainte. Les résultats principaux sont les suivants :

- Une relation entre taille et paramètres de structure a été mise en évidence pour des tailles comprises entre 2.5 et 4 nm (correspondant à la taille déterminée dans les PRO), ainsi qu'une influence des molécules organiques sur la taille et la contrainte des nano-ZnS,
- La présence de cystéine diminue significativement la taille et la contrainte des nano-ZnS,
- L'interaction entre les nano-ZnS et la cystéine est contrôlée par le groupement thiol de la cystéine,

- La présence de certaines molécules organiques (acétate, histidine, cystéine, glutathion) relâche la contrainte des nano-ZnS, ce qui stabilise des nano-ZnS de très petite taille,
- En présence d'un oxydant en excès, la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS, induite par la contrainte, n'a pas d'effet sur leur réactivité.

Cette étude à l'échelle du bécher a permis de mettre en évidence les groupements fonctionnels qui entrent en jeu dans l'interaction entre matière organique et ZnS. Elle permet de formuler une nouvelle hypothèse par rapport aux interactions dans un PRO : la présence de matière organique thiolée en grandes quantités dans un PRO explique la petite taille des ZnS formés dans les PRO. Pour pouvoir valider ou rejeter cette hypothèse, une nouvelle perspective d'étude serait d'augmenter la complexité du système. Nous avons simplifié au maximum le système pour pouvoir bien comprendre les mécanismes d'interaction. Dans un deuxième temps, il serait intéressant d'étudier l'influence de matière organique plus complexe, se rapprochant plus de la composition du PRO, sur les caractéristiques de structure des nano-ZnS. La limite de cette approche est que plus la matière organique est complexe, et moins il est possible d'étudier la structure avec la PDF qui donne un signal pour chaque paire d'atomes. En effet, l'interprétation du signal devient plus difficile lorsque la matrice est complexe. Cependant, l'étude au sein d'une matrice complexe reste possible avec l'EXAFS qui permet d'obtenir des informations sur la taille des nano-ZnS dans un intervalle restreint de tailles, comme nous l'avons observé.

La technique de la PDF a permis de mettre en évidence l'impact significatif de la présence de molécules organiques (acétate, histidine, cystéine, glutathion) qui relâchent la contrainte à la surface des nano-ZnS. Ce résultat intéressant mérite d'être étudié plus en détails : quelle est la conséquence du relâchement de contrainte des nano-ZnS vis-à-vis de leur dissolution: est-elle accélérée ou ralentie par l'apparition de défauts cristallins? De plus, un enrobage des nano-ZnS pourrait les protéger de l'oxydation de surface. Ainsi, une nouvelle perspective de travail serait de (i) étudier la formation de défauts cristallins sur des nano-ZnS après l'interaction avec des molécules organiques, puis de (ii) déterminer l'effet de l'interaction avec les molécules organiques sur la réactivité des nano-ZnS.

Pour ces travaux, la gamme de taille des nano-ZnS synthétisées (de 20 à 40 Å) correspond à la taille des nano-ZnS mis en évidence dans les PRO. Dans cette gamme, nous avons pu observer une influence de la taille et de l'interaction avec les molécules organiques sur les paramètres de structure. Il a été toutefois difficile d'observer des différences marquées de taille dans cet intervalle restreint. Les tests statistiques n'ont pas permis de conclure sur des différences de taille significatives, mais nous avons tout de même pu établir des tendances étant donné les différences qualitatives des fonctions PDF. Néanmoins, la PDF permet une détermination précise du paramètre de maille des particules, ce qui nous a permis de caractériser finement l'évolution de la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS, induite par la contrainte.



Nous n'avons pas pu valider ni rejeter l'hypothèse que nous avons faite sur la l'influence de la contrainte sur la réactivité des nano-ZnS à l'aide des deux nano-ZnS nues avec des contraintes différentes. Des expériences supplémentaires sont nécessaires afin de répondre à cette question. L'étude de la dissolution des deux nano-ZnS avec des contraintes différentes sans agent extérieur, tel que l'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub>, permettrait de répondre à cette question. En effet, l'absence d'H<sub>2</sub>O<sub>2</sub> permettrait d'étudier uniquement les caractéristiques intrinsèques des nano-ZnS. Puis, il sera intéressant d'étudier l'effet d'autres paramètres extérieurs dans le milieu tels que le Fe<sup>3+</sup>, la matière organique, des ligands potentiellement présents dans le sol (par ex. les argiles, oxydes de fer) ou des bactéries du sol. Enfin, l'étude de l'effet d'un enrobage organique sur la cinétique de dissolution de nano-ZnS synthétisées en présence de cystéine ou de glutathion permettrait de se rapprocher des caractéristiques des nano-ZnS qui se forment dans un PRO.

### **3. Devenir des nano-ZnS dans le sol**

L'une des perspectives discutées suite aux résultats de spéciation du Zn dans les PRO en fonction du traitement choisi était de déterminer le devenir des phases identifiées dans les PRO. L'objectif du chapitre 4 était de répondre en partie à cette perspective. Nous avons choisi de nous focaliser sur les nano-ZnS, phase majoritaire dans les digestats, dans le but d'évaluer plus particulièrement l'impact du recyclage agricole des digestats. Cette étude a été menée à deux échelles spatio-temporelles différentes : échelle du microcosme de sol avec des nano-ZnS synthétisées avec un suivi de la dynamique du Zn relargué sur 1 mois, et échelle de la parcelle de sol amendé avec un lisier de porc contenant des nano-ZnS pendant 11 ans. A l'échelle du microcosme, l'influence des caractéristiques du sol a été étudiée en comparant deux sols avec des caractéristiques contrastées : un Nitisol et un Arénosol. Ces deux approches complémentaires ont permis de conclure sur les points suivants :

- Les nano-ZnS synthétisées commencent à se dissoudre dans le sol dès 24 heures de contact avec le Nitisol ou l'Arénosol,
- Après 11 ans d'épandage de lisier de porc contenant 100% du Zn sous forme nano-ZnS, le sol ne contient pas de Zn sous forme de ZnS : les nano-ZnS formées dans le lisier de porc se sont dissoutes dans le sol en moins de 6 mois (date du dernier épandage de lisier de porc) dans la parcelle de sol argileux,
- Le devenir du Zn issu des nano-ZnS, en termes de disponibilité dans le sol, est contrôlé par les caractéristiques du sol : le Zn est significativement plus disponible dans l'Arénosol que dans le Nitisol après 1 mois d'incubation en microcosmes,

- Dans la parcelle de sol argileux, la totalité du Zn apporté par le lisier de porc pendant les 11 ans d'épandage est retenu dans les 30 premiers centimètres de sol et se trouve associé à la Kaolinite, aux oxydes de fer et à la matière organique.

Pour l'étude à l'échelle de la parcelle, l'EXAFS au seuil K du Zn a pu être utilisé pour déterminer la spéciation du Zn dans le sol et l'apport exogène de Zn par le lisier était assez important pour en déduire la spéciation du Zn apporté par le lisier de porc dans le sol amendé en comparant avec une parcelle témoin. Cette information a permis de mettre en évidence le rôle des composants du sol argileux dans la rétention du Zn dans les 30 premiers centimètres du sol.

Ce résultat concorde avec les différences observées à plus petite échelle : il y a moins de Zn labile issu de la dissolution des nano-ZnS dans le Nitisol qui contient des oxydes de fer, des argiles et plus de matière organique que l'Arénosol. L'utilisation de deux sols contrastés a permis de mettre en évidence le rôle crucial des caractéristiques du sol dans le devenir du Zn issu de la dissolution des nano-ZnS. A présent, il est nécessaire de déterminer précisément quels sont les composants qui influencent la rétention du Zn afin de pouvoir prévoir plus largement le devenir des nano-ZnS dans différents sols. Pour cela, une étude avec plus de sols pourrait être menée afin de déterminer par des méthodes statistiques quels sont les paramètres qui contrôlent le devenir du Zn provenant des nano-ZnS dans le sol.

La limite de cette étude est que la proportion de nano-ZnS dissoutes n'a pas pu être quantifiée. Nous n'avons donc pas pu répondre à la question : quelle est la cinétique de dissolution des nano-ZnS dans le sol ? En effet, si le Zn issu de la dissolution se fixe immédiatement aux ligands du sol, il n'est pas quantifiable. Cependant, des modélisations sont prévues afin de quantifier la proportion de nano-ZnS qui se sont dissoutes.

A propos de la question « quel est le devenir des phases identifiées dans les PRO dans le sol ? », nous pouvons donc dire que la phase nano-ZnS commence à se dissoudre dès 24 heures de contact dans le sol et que la disponibilité du Zn issu de la dissolution dépend des caractéristiques du sol. A l'échelle du microcosme, il est important de noter que la dissolution très rapide des nano-ZnS n'est pas tout à fait extrapolable aux nano-ZnS formées dans les PRO. En effet, comme discuté précédemment, la matière organique interagit avec les ZnS et peut ralentir ou accélérer la dissolution des ZnS. De plus, la matière organique apportée peut changer la dynamique du Zn dans le sol. Ainsi, il est nécessaire de continuer cette étude en complexifiant le système étudié avec un PRO contenant des nano-ZnS. De plus, il est nécessaire de déterminer le devenir des autres phases identifiées dans les PRO (par ex. phosphate de Zn amorphe). D'autres études à l'échelle de la parcelle et sur le long terme, sur différents types de sol est nécessaire pour une approche plus globale et réaliste du devenir du Zn dans le sol.

## **4. Implication environnementale : devenir du Zn des PRO après méthanisation et recyclage agricole**

L'étude des nano-ZnS à différentes échelles a permis d'obtenir des résultats concernant la question du devenir du Zn après méthanisation et recyclage agricole. En effet, le traitement a une influence majeure sur la spéciation du Zn dans le PRO. Les digestats contiennent la majorité du Zn sous forme de nano-ZnS qui sont réactifs et se dissolvent rapidement dans le sol. Mais leur devenir dans le sol, en terme de disponibilité, est contrôlé par le type de sol. Le compostage du digestat, change complètement la spéciation du Zn, qui est plutôt sous forme de phosphate de Zn amorphe ou sorbé aux oxydes de fer.

**Le devenir du Zn, en termes de spéciation et de disponibilité, est contrôlé par le couple : Choix du traitement – Caractéristiques du sol amendé.**

L'approche multi-échelle a été un point fort pour établir cette conclusion. En effet, la caractérisation fine des nano-ZnS de différentes tailles synthétisées a permis de mettre en évidence les caractéristiques de structure différentes selon la taille des nano-ZnS. Cette série de nano-ZnS bien caractérisées a été un élément fondamental pour la mise en évidence des nano-ZnS dans le lisier de porc et dans l'ensemble des PRO étudiés. Puis, l'étude à l'échelle du bécher a permis de mettre en évidence des mécanismes d'interaction entre des molécules organiques présentes dans un PRO et les nano-ZnS. Enfin, l'incubation de nano-ZnS synthétisées dans des microcosmes de sol a permis de mettre en évidence le devenir de cette phase, indépendamment de l'apport de matière organique du PRO.

Cette méthodologie pourrait être appliquée à d'autres contaminants inorganiques présents dans les PRO. Par exemple, le second élément le plus présent dans les PRO est le cuivre et son devenir après méthanisation et recyclage agricole nécessite d'être étudié également. Le cadmium est présent en quantités beaucoup moins importantes, mais est plus toxique que le Zn et le cuivre. Ainsi, son devenir pourrait également être étudié. Par contre, sa plus faible concentration signifie que sa détection dans le PRO sera limitée. Par exemple, la détection du signal XANES par les cristaux analyseurs qui permet d'analyser des échantillons peu concentrés (jusqu'à 1 mg/kg) pourrait être développée pour étudier la spéciation d'autres contaminants pertinents dans le cadre de l'étude du risque du recyclage des digestats.

L'influence des microorganismes du sol sur la dissolution des nano-ZnS n'a pas été étudiée. Si la cinétique de dissolution des nano-ZnS est déterminée dans différents sols, il serait intéressant de caractériser les communautés bactériennes et d'identifier des groupes de microorganismes susceptibles d'accélérer la dissolution des nano-ZnS. Les

hypothèses formulées pourraient être étudiées dans des conditions contrôlées en milieux aqueux. Cette information pourrait servir à mieux prédire le devenir des nano-ZnS selon les caractéristiques du sol. L'impact de l'apport de nano-ZnS via l'épandage des digestats sur l'activité des microorganismes du sol est également une question importante. En effet, la réaction des microorganismes suite à l'exposition du contaminant est une information sur la toxicité du contaminant vis-à-vis des microorganismes.

Pour aller plus loin dans l'impact du recyclage des PRO sur le devenir du Zn, une étape incluant des plantes est nécessaire. En effet, cela permettrait de mesurer la biodisponibilité du Zn après apport de nano-ZnS. De plus, nous avons vu dans la partie bibliographique que les plantes peuvent avoir un effet sur la dissolution des ZnS. L'ajout de plantes dans le système d'étude serait plus réaliste dans un contexte de recyclage agricole car les sols agricoles contiennent toujours des plantes qui modifient les conditions physico-chimiques du sol.

Les résultats expérimentaux de la thèse seront utilisés pour un outil d'aide à la décision pour le traitement des PRO dans le but de limiter l'impact environnemental du recyclage des PRO vis-à-vis des contaminants inorganiques, organiques et biologiques, dans le cadre de l'ANR Digestate.

## References

- Chaudri, A. M., Allain, C. M. G., Barbosa-Jefferson, V. L., Nicholson, F. A., Chambers, B. J., McGrath, S. P. (2000). A study of the impacts of Zn and Cu on two rhizobial species in soils of a long-term field experiment. *Plant and Soil*, 221(2), 167-179.
- Donner, E., Howard, D. L., Jonge, M. D. d., Paterson, D., Cheah, M. H., Naidu, R., Lombi, E. (2011). X-ray Absorption and Micro X-ray Fluorescence Spectroscopy Investigation of Copper and Zinc Speciation in Biosolids. *Environmental science & technology*, 45(17), 7249-7257.
- Hoornweg, D., Bhada-Tata, P. (2012). What a waste: a global review of solid waste management.
- Kim, B., Levard, C., Murayama, M., Brown, G. E., Hochella, M. F. (2014). Integrated Approaches of X-Ray Absorption Spectroscopic and Electron Microscopic Techniques on Zinc Speciation and Characterization in a Final Sewage Sludge Product. *Journal of Environmental Quality*, 43(3), 908-916.
- Leclerc, A., Laurent, A. (2017). Framework for estimating toxic releases from the application of manure on agricultural soil: National release inventories for heavy metals in 2000-2014. *Science of the total environment*, 590, 452-460.
- Legros, S., Levard, C., Marcato-Romain, C. E., Guiresse, M., Doelsch, E. (2017). Anaerobic Digestion Alters Copper and Zinc Speciation. *Environmental science & technology*, 51(18), 10326-10334.
- Lombi, E., Donner, E., Tavakkoli, E., Turney, T. W., Naidu, R., Miller, B. W., Scheckel, K. G. (2012). Fate of Zinc Oxide Nanoparticles during Anaerobic Digestion of Wastewater and Post-Treatment Processing of Sewage Sludge. *Environmental science & technology*, 46(16), 9089-9096.
- Nolan, A. L., Lombi, E., McLaughlin, M. J. (2003). Metal bioaccumulation and toxicity in soils—why bother with speciation? *Australian Journal of Chemistry*, 56(3), 77-91.
- Tella, M., Bravin, M. N., Thuriès, L., Cazevieille, P., Chevassus-Rosset, C., Collin, B., Chaurand, P., Legros, S., Doelsch, E. (2016). Increased zinc and copper availability in organic waste amended soil potentially involving distinct release mechanisms. *Environmental Pollution*, 212, 299-306.
- Voegelin, A., Jacquat, O., Pfister, S., Barmettler, K., Scheinost, A. C., Kretzschmar, R. (2011). Time-Dependent Changes of Zinc Speciation in Four Soils Contaminated with Zincite or Sphalerite. *Environmental science & technology*, 45(1), 255-261.



## **Chapitre 6 - Matériels et méthodes**





## Sommaire

<b>1. Matériaux .....</b>	<b>239</b>
1.1. Synthèse de nanoparticules .....	239
1.1.1. Protocole général .....	239
1.1.2. Synthèse en absence d'oxygène .....	239
1.1.3. Molécules organiques .....	240
1.1.4. Synthèse à partir de $^{68}\text{ZnO}$ pour incubation dans les sols.....	242
1.2. Description des 2 sols utilisés.....	242
1.3. Utilisation des matériaux dans la thèse .....	243
<b>2. Etude de la stabilité des nano-ZnS .....</b>	<b>245</b>
2.1. Dissolution des nano-ZnS en conditions contrôlées .....	245
2.2. Incubations en conditions contrôlées de sol + nano- $^{68}\text{ZnS}$ .....	246
2.2.1. Préparation des microcosmes .....	246
2.2.2. Diffusive Gradient in Thin Film (DGT) .....	247
2.2.3. Extraction de la solution de sol .....	248
2.2.4. Mesure activité microbienne .....	249
<b>3. Méthodes de caractérisation .....</b>	<b>250</b>
3.1. Caractérisation de la structure.....	250
3.1.1. Microscopie électronique à transmission .....	250
3.1.2. Diffraction des rayons X .....	250
3.1.2.1. Protocole pour nano-ZnS nues série 5, nano- $^{68}\text{ZnS}$ .....	251
3.1.2.2. Protocole pour nano-ZnS nues série 1, série 2, nano-ZnS avec MO	251
3.1.2.3. Calcul de la taille .....	251
3.1.3. Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX) .....	253
3.1.3.1. Principe .....	253
3.1.3.2. Formalisme EXAFS .....	255
3.1.3.3. Mise en œuvre expérimentale .....	256
3.1.3.4. Traitement du signal .....	257

3.1.4. Diffusion totale des rayons X aux grands angles et analyse par fonction PDF .....	259
3.1.4.1. Principe .....	259
3.1.4.2. Mise en œuvre expérimentale .....	261
3.1.4.3. Traitement du signal .....	262
3.2. Caractérisation chimique.....	265
3.2.1. ICP-AES .....	265
3.2.2. ICP-MS .....	266
3.2.2.1. Principe et utilisation .....	266
3.2.2.2. Calcul de la concentration en Zn provenant des nano- <sup>68</sup> ZnS.....	266
Références.....	271

Ce chapitre apporte des détails supplémentaires aux informations déjà apportées en début de chaque chapitre dans les paragraphes « Matériel et méthodes » respectifs. Par exemple, des détails sur la synthèse des nano-ZnS sont ajoutés, les molécules organiques utilisées, la préparation du sel de zinc (Zn) enrichi en  $^{68}\text{Zn}$ , les protocoles appliqués aux sols sont présentés dans ce chapitre. Les protocoles développés pour l'étude de la cinétique des nano-ZnS synthétisées sont repris avec plus de détails. Enfin, les méthodes de caractérisation utilisées dans la thèse sont décrites.

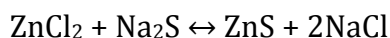
## **1. Matériaux**

### **1.1. Synthèse de nanoparticules**

#### **1.1.1. Protocole général**

Pour synthétiser des nano-ZnS, le soufre réduit  $\text{S}^{2-}$  sous forme de sulfure de sodium ( $\text{Na}_2\text{S}$ ) en solution est mélangé au Zn sous forme de chlorure de Zn en solution. Le facteur variant afin d'obtenir des nano-ZnS de différentes tailles est le rapport molaire S/Zn. Le protocole général est le suivant: la solution de soufre est mélangée à la solution de Zn. Puis la suspension de ZnS est agitée à l'abri de la lumière. Après l'agitation, les ions qui n'ont pas précipité sous forme de ZnS ( $\text{Na}^+$ ,  $\text{Cl}^-$ ,  $\text{Zn}^{2+}$ ,  $\text{S}^{2-}$ ) sont éliminés soit par dialyse ou par centrifugation. En général, une série de nanoparticules a été synthétisée par objectif pour éviter le vieillissement des suspensions pendant le stockage de longue durée. En fonction de la série synthétisée, certains paramètres de synthèse varient (atmosphère aérobie/anaérobie, temps d'agitation, méthode de séparation ZnS/ions).

L'équation de la réaction est la suivante :



#### **1.1.2. Synthèse en absence d'oxygène**

Les synthèses en absence d'oxygène (séries 2, 3 et 4) ont été menées en boîte à gants sous atmosphère azotée. Le taux d'oxygène était de 0.3 % (+/- 1). L'eau ultrapure utilisée pour la synthèse a été désoxygénée par un bullage de l'azote dans l'eau ultrapure placée dans un bain marie à 80°C pendant 1 heure pour 1 L d'eau. Ensuite, la bouteille a été rapidement transférée dans la boîte à gants pour refroidir une nuit dans une atmosphère désoxygénée. Le taux d'oxygène dans l'eau a été mesuré avant la synthèse était inférieur ou égal à 0.4 ppm. Cette eau ultrapure désoxygénée a été utilisée pour mettre en solution les sels de  $\text{Na}_2\text{S}$  et  $\text{ZnCl}_2$ . Pour éviter de produire une atmosphère trop riche en  $\text{H}_2\text{S}$ , l'air

de la boîte à gants a été pompé et a bullé dans une solution de nitrate d'argent ( $\text{AgNO}_3$ ) pour neutraliser le soufre de l'air en précipitant du sulfure d'argent.

Pour la série de nano-ZnS nues (série 2), l'agitation s'est faite dans la boîte à gants sous atmosphère azotée. Pour les séries 3 et 4, les suspensions ont été transférées dans des flacons qui sont sertis dans la boîte à gants. Les suspensions ont été agitées à l'abri de la lumière sur des plaques aimantées à l'extérieur de la boîte à gants et les conditions anaérobies étaient maintenues grâce au sertissage des flacons.

### 1.1.3. Molécules organiques

Les structures des molécules organiques utilisées pour les synthèses des séries 3 et 4 sont décrites plus en détail ici.

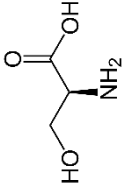
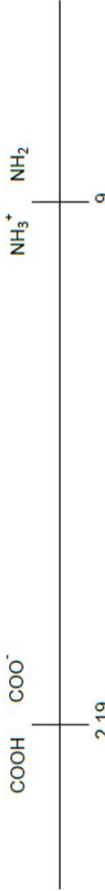
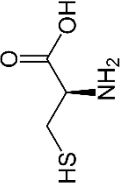
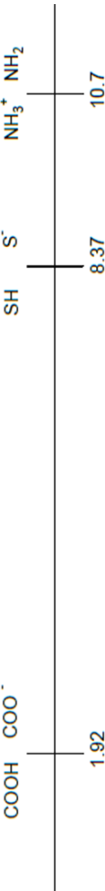
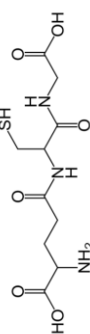

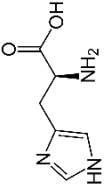
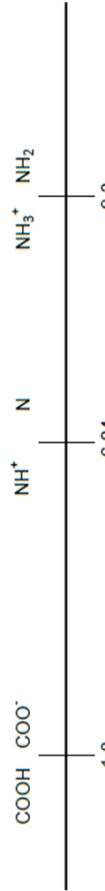
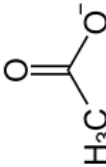
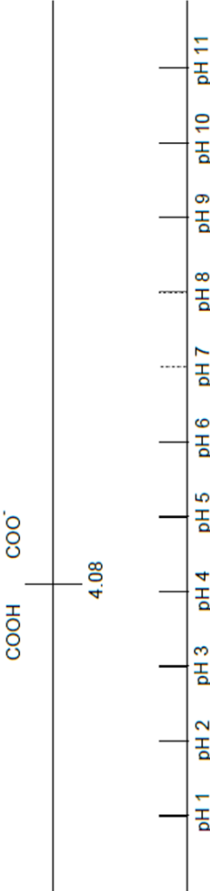
La solution d'HEPES et la solution de molécule organique ont été mélangées après ajustement du pH à 7 dans chacune des solutions avec HCl ou NaOH. Sachant que tous les composés organiques ne nécessitent pas la même quantité de NaOH ou de HCl pour l'ajustement du pH, la force ionique a été ajustée à la même valeur pour chacune des synthèses en ajoutant du nitrate de sodium ( $\text{NaNO}_3$ ). Puis la solution de  $\text{ZnCl}_2$  et la solution de ( $\text{Na}_2\text{S}$  + HEPES, pH 8.5) ont été ajoutées au système l'une après l'autre. Le pH a été mesuré à chaque étape de la synthèse et le pH final était de  $7.0 \pm 0.1$  pour chaque synthèse.

Les molécules organiques ont été choisies pour leurs groupements fonctionnels :

- La **sérine** possède la structure simple d'un acide aminé avec un groupement carboxylique ( $-\text{COOH}$ ), un groupement amine ( $-\text{NH}_2$ ) et un groupement hydroxyle ( $-\text{OH}$ )
- La **cystéine** qui a la même structure que la sérine avec un groupement thiol ( $-\text{SH}$ ) à la place du groupement hydroxyle de la sérine
- Le **glutathion** qui est une molécule plus grosse composé de 3 acides aminés: l'acide glutamique, la cystéine, glycine. Cette molécule est plus représentative des grosses molécules que l'on trouve dans l'environnement.
- L'**histidine**, un acide aminé avec un groupement imidazole au lieu du groupement thiol de la cystéine ou hydroxyle de la sérine.
- L'**acétate**, une molécule simple avec un groupement carboxylique et un groupement méthyle, présente en forte quantité dans les digesteurs car c'est le produit de l'acétogénèse.

Ces molécules ont également été choisies pour leurs affinités différentes avec le Zn (voir  $\log K$ , (Smith et Martell, 2004 )Tableau 1Tableau ).

Tableau 1 : formule, log K et pKa des groupements fonctionnels de chaque molécule organique utilisée pour les synthèses

Molécule	Formule	Log K à 25°C et I=0.1M	pKa des groupements fonctionnels
Sérine		4.6	
Cystéine		9.11	
Clutathion		n/a	
Histidine		6.51	
Acétate		n/a	

#### 1.1.4. Synthèse à partir de $^{68}\text{ZnO}$ pour incubation dans les sols

L'oxyde de Zn enrichi à 99.16% en  $^{68}\text{Zn}$  (Isoflex) a été utilisé pour la synthèse de nano-ZnS utilisée pour suivre la dissolution des nanoparticules dans des échantillons de sol. Ces sols contiennent du Zn naturel et grâce à l'utilisation de nano-ZnS marquées, il est possible de distinguer le Zn issu de la dissolution des nano- $^{68}\text{ZnS}$  du Zn naturellement présent dans le sol. Les distributions isotopiques du Zn naturel et du  $^{68}\text{ZnO}$  sont indiquées dans le Tableau 2. Le Zn enrichi en  $^{68}\text{Zn}$  est le traceur pour le suivi de la dissolution des nano-ZnS.

Tableau 2 : Abondances des isotopes stables du Zn

Isotope	$^{64}\text{Zn}$	$^{66}\text{Zn}$	$^{67}\text{Zn}$	$^{68}\text{Zn}$	$^{70}\text{Zn}$
Zn naturel	48.89	27.81	4.11	18.57	0.62
$^{68}\text{ZnO}$ <sup>1</sup>	0.03	0.16	0.62	99.16	0.03

Pour obtenir une solution de chlorure de  $^{68}\text{Zn}$  à partir de  $^{68}\text{ZnO}$ , 0.8 mmoles de  $^{68}\text{ZnO}$  (67 mg) ont été dissoutes dans 23 mL d'HCl (VWR trace metal analysis) à 0.1 M. Le pH était de 1.2 et a été ajusté à 5.1 avec NaOH dilué à partir d'une ampoule de NaOH concentrée. A cette étape de la synthèse 100  $\mu\text{L}$  ont été prélevés et dilués dans 5mL d'eau ultrapure pour mesure du rapport isotopique du traceur. Puis, le protocole général de la synthèse de nano-ZnS a été suivi.

## 1.2. Description des 2 sols utilisés

Les deux sols utilisés sont des sols remaniés issus de deux sites d'expérimentation longue durée du réseau SOERE-PRO : La Mare sur l'île de la Réunion et Sangalkam au Sénégal. Les deux sols correspondent à la parcelle témoin n'ayant pas été amendée par des PRO.

Le sol de La Mare est un Nitisol qui provient d'un site expérimental situé au Nord de l'île de la Réunion à une altitude de 60 mètres. Les coordonnées géographiques du centre de la parcelle sont : 20°54'11"S et 55°31'47"E. La pluviométrie de la zone est d'environ 1800 mm/an et la température moyenne est de 24°C.

Le sol de Sangalkam est un Arénosol qui provient d'un site expérimental de la région de Dakar où la pluviométrie est environ de 500 mm/an avec une saison sèche et une saison pluvieuse et une température moyenne mensuelle entre 17 et 30 °C.

<sup>1</sup> D'après le certificat d'analyse fourni par Isoflex

Après échantillonnage, les sols ont été séchés à 40°C et tamisés à 2 mm. Le séchage à 40°C permet de conserver le sol relativement sec sans déstructurer le sol. Cependant, il y a une quantité d'eau résiduelle après séchage à 40°C. Ainsi, il a été nécessaire de déterminer cette humidité résiduelle pour ajuster l'eau à ajouter pour l'incubation. Pour déterminer l'humidité résiduelle des sols, 10g de sol (séché à 40°C) ont été séchés à 105°C en triplicat jusqu'à masse constante. Après les avoir laissé refroidir dans un dessiccateur, les sols ont été pesés. La masse de sol après séchage à 105°C correspond à la masse de matière sèche du sol. La différence entre la masse du sol pesé après séchage à 40°C et la masse de matière sèche permet de déterminer l'humidité relative (HR) du sol:

$$HR (\%) = (P_h - P_s) / P_s * 100$$

Avec

$P_h$ : la masse du sol humide, soit après séchage à 40°C

$P_s$ : la masse du sol sec, soit après séchage à 105°C

La moyenne des valeurs d'HR des 3 répliques est considérée : 3.7% pour le Nitisol et 0.9 % pour l'Arénosol.

Pour déterminer la capacité maximale de rétention d'eau (CMR), 3 \* 30 g de chaque sol a été introduit dans des microcosmes ayant pour fond une toile perméable et tassé à la densité prévue pour l'incubation. Chaque microcosme a été saturé en eau en les laissant imbiber *per ascensum* jusqu'à l'apparition d'une couche luisante à la surface. L'étape suivante est le ressuyage et consiste à laisser les sols saturés en eau sur une grille au-dessus d'un évier pour laisser évacuer l'excédent d'eau. Les microcosmes sont pesés toutes les heures et le temps à partir duquel le poids des microcosmes est stable correspond au point de ressuyage.

$$CMR = (\text{Poids sol humide au point de ressuyage} - \text{Poids sol sec}) / \text{Poids sol sec}$$

Pour les deux sols, le temps de ressuyage était de 4h30 et les valeurs de CMR sont de 45% pour le sol de La Mare et de 32% pour le sol de Sangalkam.

### **1.3. Utilisation des matériaux dans la thèse**

Tableau 3 : Utilisation des matériaux dans la thèse

Matériaux	Utilisation des matériaux dans les chapitres et objectif	Caractérisation				Etude de la stabilité des nano-ZnS
		EXAFS	DRX	MET	PDF	
Nano-ZnS	Nano-ZnS nues série 1	x	x	x		
	Nano-ZnS nues série 2		x		x	
	Nano-ZnS nues série 5		x	x	x	Expérience de dissolution des nano-ZnS
	Nano- <sup>68</sup> ZnS		x			Incubations en conditions contrôlées de sol + nano- <sup>68</sup> ZnS
	Nano-ZnS avec MO, séries 3 et 4		x		x	
PRO	PRO	x				
Sols	Sols		x			Incubations en conditions contrôlées de sol + nano- <sup>68</sup> ZnS



## 2. Etude de la stabilité des nano-ZnS

### 2.1. Dissolution des nano-ZnS en conditions contrôlées

L'objectif de cette expérience était de déterminer la cinétique de dissolution des ZnS en fonction de leur taille. Le contexte de cette expérience et les résultats sont présentés dans le chapitre 3. La dissolution des 2 nano-ZnS (petite nano-ZnS et grande nano-ZnS) et de la micro-ZnS a été suivie au cours du temps avec des prélèvements réguliers. La suspension de ZnS à 75 mg/L dans un volume de 400 mL était maintenue à 25°C +/- 0.5°C dans un réacteur à double enveloppe relié à un refroidisseur à circulation (Julabo FL601). Le pH était maintenu à 5 grâce au titrateur Titrino 785 DMP et au logiciel Tiamo 2.3. Le titrateur et la configuration d'un programme spécifique avec le logiciel Tiamo permettent de mesurer le pH en continu et d'ajouter de l'acide (HCl VWR trace metal analysis à 0.01M) pour maintenir le pH à 5. La suspension était agitée par une pale en téflon à 500 rpm à l'abri de la lumière. A t=0, du peroxyde d'hydrogène a été ajouté au système de façon à avoir un rapport molaire  $H_2O_2/ZnS$  de 11. Il s'agit d'un oxydant qui induit la dissolution oxydative des ZnS. La durée totale est de 6 jours pour la micro-ZnS, 54 heures pour la petite nano-ZnS = 0.9 et de 72 heures pour la grande nano-ZnS. 10 à 11 points de cinétiques ont été définis sur cette période avec des prélèvements plus réguliers au début de l'expérience.



Figure 1 : dispositif expérimental pour l'expérience de dissolution des nano-ZnS

A différents points de cinétique définis, 2 mL de suspension ont été prélevés en triplicat pour une mesure de la concentration en Zn dissous. Pour séparer la fraction nanoparticulaire de la fraction dissoute, des tubes d'ultrafiltration à centrifuger Amicon Ultra-4 avec un seuil de coupure à 3 kDa ont été utilisés. Après centrifugation à 4000 g

pendant 40 minutes le filtrat récupéré est dilué dans un volume final de 6 mL à 2% d'HNO<sub>3</sub> pour analyse chimique en ICP-AES. Au début de l'expérience, au milieu et à la fin, 1 mL de la suspension dans le réacteur est prélevé en triplica pour dosage du Zn total. Cet aliquote est dilué dans un volume total de 6 mL à 2% d'HNO<sub>3</sub> pour analyse chimique en ICP-AES.

## 2.2. Incubations en conditions contrôlées de sol + nano-<sup>68</sup>ZnS

### 2.2.1. Préparation des microcosmes

Chaque sol a été séché à 40 °C, refroidi 10 minutes dans un récipient fermé puis pesé. Avant séparation en différents microcosmes de 30g de sol, le sol a été mélangé avec les nano-<sup>68</sup>ZnS. 690 g de chacun des 2 sols (équivalent sec) a été mélangé avec 10.4 mg de nano-<sup>68</sup>ZnS pendant 1 h à l'aide d'un mélangeur de poudre (Mélangeur 3D Turbula T2F - T10B - T50A). La même quantité de sol a été pesée et mélangée pendant 1h sans nano-<sup>68</sup>ZnS. Premièrement, un dispositif DGT a été introduit dans le fond du microcosme. Puis le sol, pré-humidifié et mélangé avec  $\frac{2}{3}$  de l'eau ultrapure ajoutée au total, a été introduit dans le microcosme. Le sol a été ensuite tassé à la densité déterminée au préalable : 1.3 g/cm<sup>3</sup> pour le Nitisol et 2.1 g/cm<sup>3</sup> pour l'Arénosol. Ensuite le  $\frac{1}{3}$  restant d'eau ultrapure a été ajouté. Les microcosmes ont ensuite été incubés dans une enceinte thermostatée. Chaque semaine, le poids des microcosmes était ajusté pour compenser l'évaporation.



Figure 2 : microcosmes de sol et enceinte thermostatée

Puis, 4 microcosmes par conditions ont été sortis de l'étuve pour récupérer la DGT, extraire la solution de sol et mesurer l'activité microbienne aux points de cinétiques suivants: 1 jour, 3 jours, 7 jours, 14 jours, 28 jours.

### 2.2.2. Diffusive Gradient in Thin Film (DGT)

La DGT est une technique qui permet de connaître la disponibilité d'éléments traces *in-situ* dans des matrices environnementales comme l'eau, les sédiments ou le sol. Il s'agit d'un capteur passif composé d'une résine échangeuse d'ions (Chelex), d'un gel de diffusion (gel de polyacrylamide réticulé avec un dérivé d'agarose (APA)) et d'une membrane filtrante en polyéthersulfone associés dans un support refermé avec une ouverture circulaire de 2 cm de diamètre appelée la fenêtre d'exposition, comme présenté sur la Figure 3. La résine mime l'assimilation des éléments chimiques par les plantes en adsorbant les éléments du sol et agit comme un puits qui induit la diffusion des éléments à travers le gel de diffusion. Ceci diminue la concentration en ETM dans la solution du sol et engendre un réapprovisionnement provenant du pool d'ETM labiles de la phase solide du sol: ce procédé est similaire à l'assimilation des ETM par les plantes.

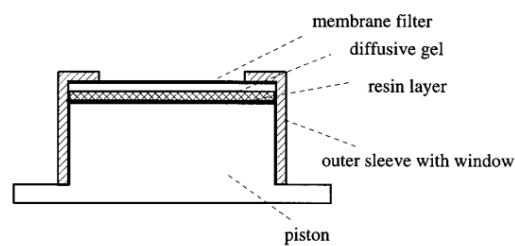


Figure 3 : schéma décrivant le dispositif DGT (Diffusive Gradient in Thin Film). Issu de Zhang et al. (1998)

Le gel de diffusion permet de contrôler le transport des ETMs de la solution de sol à la résine indépendamment de l'hydrodynamique de la solution. En effet, avec la résine seule, le taux de transport des ions de la solution à la résine est variable dans le temps à cause de procédés de convection irréguliers (Davison et Zhang, 1994). Après une certaine durée, la quantité d'éléments accumulés sur la résine est mesurée. Cet outil a été développé pour doser les éléments labiles dans l'eau, ainsi que leur flux dans les sédiments, puis la technique a été adaptée pour les sols (Zhang *et al.*, 1998; Hooda *et al.*, 1999). Si la résine n'est pas saturée et que la concentration en solution est constante, un gradient de concentration linéaire est établi dans le gel de diffusion (voir Figure 4). Si ce gradient de concentration est constant, la concentration dans la solution de sol peut être obtenu par l'équation suivante:

$$C = M\Delta g/DtA$$

Avec:

M : masse d'ions accumulée sur la résine

C : la concentration de l'ion libre dans la solution de sol.

$\Delta g$  : l'épaisseur du gel de diffusion

D : le coefficient de diffusion de l'ion métallique dans le gel de diffusion (égal au coefficient de diffusion dans l'eau)

t : temps de déploiement

A : surface de contact entre le gel de diffusion et le sol

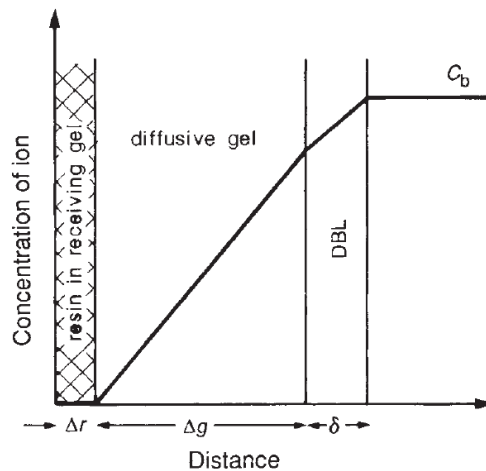


Figure 4 : Représentation schématique de la concentration en espèce ionique dans l'assemblage de la DGT en contact avec de l'eau dans laquelle la concentration est  $C_b$  (BDL = Diffusive Boundary Layer, la couche de diffusion à l'interface de la solution et du gel de diffusion de la DGT). Schéma issu de Davison et Zhang (1994)

Dans le cadre de la thèse, la DGT a été utilisée dans des incubations de sol en contact de nano-ZnS afin de suivre la dissolution des nano-ZnS dans le sol. Différents résultats ont été observés lors de l'utilisation de DGT en présence de nanoparticules. Par exemple, Van Der Veecken *et al.* (2008) montrent que des particules de latex de 81 et 260 nm passent à travers le gel de diffusion. Pouran *et al.* (2014) ont montré que les nanoparticules de ZnO de 30 nm diffusent à travers le gel et se fixent à la résine. Pham *et al.* (2015) montrent que la diffusion du Zn à travers le gel diminue en présence de nano-ZnS de 3.7 nm. Ces différentes études émettent un doute sur la pertinence d'utilisation de DGT en présence de NPs. C'est pourquoi, la nano-DGT a été utilisée pour les incubations sol + nano-ZnS: il s'agit d'une DGT avec une membrane de dialyse (seuil de coupure: 3kDa) directement montée par la société DGT Research et qui a déjà été utilisée pour doser les ETM labiles dans le sol (Pouran *et al.*, 2014; Sekine *et al.*, 2014). La membrane de dialyse à 3 kDa empêche les nano-ZnS de diffuser dans le gel et de se fixer à la résine et/ou de limiter la diffusion des ions jusqu'à la résine.

### 2.2.3. Extraction de la solution de sol

La solution de sol correspond à l'eau porale du sol extraite par centrifugation. Le sol des 4 microcosmes / condition a été également récupéré à chaque point de cinétique. 2\*0.3 g ont été conservés à 4°C pendant 24 heures pour la mesure d'activité microbienne. Le reste du sol a été réparti dans deux seringues qui contenaient un tissu filtrant dans le fond. Les seringues ont été introduites dans des tubes de centrifugation de 50 mL et ont été centrifugées à 3354 g et 4°C pendant 1 heure pour le Nitisol et 30 minutes pour l'Arénosol. La solution de sol a été récupérée dans le fond des tubes de centrifugation

correspondant aux 4 répliques d'une condition et mélangés pour avoir un volume suffisant pour les étapes suivantes. Après le mélange, la solution de sol a été filtrée à 0.22 µm avec un filtre préalablement rincé à l'eau ultrapure. Le pH a été mesuré dans la solution de sol filtrée. Le volume a été ajusté à 7.5 mL avec de l'eau ultrapure puis l'acidité a été ajustée à 2% HNO<sub>3</sub> pour conservation à 4°C et analyse ICP-MS.

#### 2.2.4. Mesure activité microbienne

Le test de la fluorescéine diacétate est un test qui permet de mesurer l'activité bactérienne totale dans un sol (Green *et al.*, 2006). Ce test a été effectué sur le sol humide récupéré dans le microcosme. L'objectif est de quantifier l'activité microbienne du sol. En effet, la quantité de fluorescéine produite par hydrolyse de la fluorescéine diacétate (FDA) est directement proportionnelle à l'activité microbienne totale. La fluorescéine diacétate (3'6'-diacetyl-fluorescéine) est une fluorescéine conjuguée à deux radicaux acétate. Ce composé incolore est hydrolysé par les enzymes libres (exoenzymes) et membranaires, relarguant un produit final coloré, la fluorescéine qui absorbe fortement dans les longueurs d'ondes visibles (490 nm).

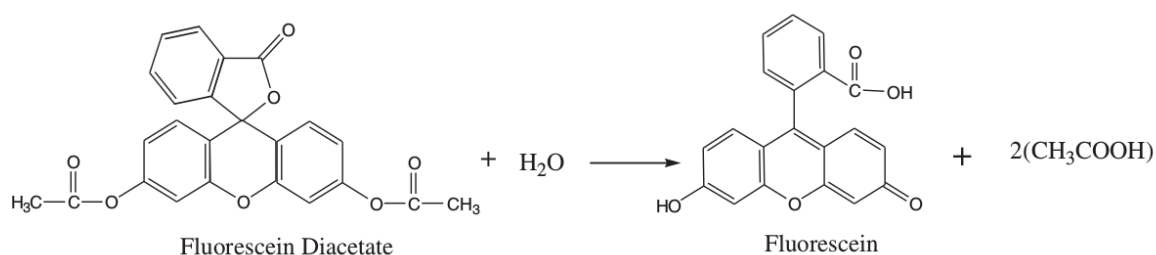


Figure 5 : réaction d'hydrolyse de la fluorescéine diacétate

Pour chaque réplique, 9 mL de tampon phosphate (50 mM, pH 7) ont été ajoutés aux deux tubes contenant chacun 0.3 mg de sol. Dans l'un des tubes, 100 µL de solution de FDA (50 mM, solvant acétone) a été ajouté. Le deuxième tube était le tube témoin. Les deux tubes ont été bien agités à l'aide d'un vortex et incubés à 37°C au bain marie pendant 1h. A la fin de l'incubation, 2 mL d'acétone ont été ajoutés dans les deux tubes pour stopper la réaction, puis 100 µL de FDA ont été ajoutés dans le tube témoin. Puis, les deux tubes ont été centrifugés à 4800 rpm et les surnageants ont été filtrés à 0.45 µm avant mesure de l'absorbance à 490 nm avec mesure en parallèle de la matrice référence (mélange de tampon phosphate (82%) et acétone (18%)). La concentration en fluorescéine a été déterminée grâce à une calibration faite au préalable.

### 3. Méthodes de caractérisation

#### 3.1. Caractérisation de la structure

##### 3.1.1. Microscopie électronique à transmission

Cette technique a été utilisée pour déterminer la forme des particules et estimer leur taille. Le faisceau d'électrons est fourni par une cathode LaB6 soumise à un champ électrique intense puis accéléré et collimaté par des anodes. La différence de potentiel entre la cathode et la dernière anode définit la tension d'accélération des électrons. Pour permettre la focalisation ainsi que les réglages de la taille du faisceau, ce dernier traverse une série de lentilles et de diaphragmes appelée système condenseur. La MET est adaptée à l'étude des nano-systèmes puisque la résolution spatiale est de 2 Å. Les échantillons ont été préparés par dépôt goutte après dilution de la suspension sur une grille de carbone (maillage 400 mesh).

Pendant la thèse deux microscopes différents ont été utilisés pour caractériser les nano-ZnS synthétisés.

- Nano-ZnS nues Série 1 : observation des électrons transmis au travers d'un échantillon avec l'appareil JEOL JEM-2010 (200kV).
- Nano-ZnS Série 5 : observation des électrons transmis avec un microscope FEI OSIRIS (200 keV). Les images en mode STEM (Scanning Transmission Electron Microscope) ont été obtenues par balayage avec un spot de 1.5 Å et en mode HAADF (High Angle Annular Dark Field).

##### 3.1.2. Diffraction des rayons X

La diffraction des rayons X est une technique utilisée pour l'identification la nature et la structure de phases cristallines ainsi que pour déterminer la taille des cristallites, appelée encore domaine de cohérence des particules. En effet, la position des pics de diffraction est influencée par la nature de la phase cristalline. La largeur des pics dépend de l'élargissement instrumental, l'élargissement dû aux micro-contraintes du cristal, l'élargissement dû à la taille des domaines de cohérence, ou cristallites. Dans le cas d'une poudre à orientation supposée parfaitement statistique, il existe une famille de plans (hkl) présentant au faisceau de rayons X un angle d'incidence  $\theta$  compatible avec la loi de Bragg:

$$n\lambda = 2 \cdot d \cdot \sin\theta$$

Avec

$d$  : la distance inter-réticulaire

$\theta$  : demi angle de déviation

$n$  : ordre de diffraction

$\lambda$  : longueur d'onde des rayons X incidents

Ainsi, à partir des données correspondant à la sphalérite provenant d'une banque de donnée minéralogique, il est possible d'identifier cette phase cristalline à partir de la position des pics de diffraction.

Les matériaux utilisés dans la thèse ont été séchés par lyophilisation puis broyés dans un mortier en agate avant d'être analysés de deux manières différentes:

#### 3.1.2.1. Protocole pour nano-ZnS nues série 5, nano-<sup>68</sup>ZnS

Au CEREGE (nano-<sup>68</sup>ZnS, nano-nues série 1) sur le diffractomètre X-Pert PRO (PANalytical) avec une anti-cathode de cobalt comme source de rayons X ( $\lambda_{\text{K}\alpha} = 1.79 \text{ \AA}$ ), à 40kV et 40 mA. Dans ce cas, l'échantillon, sous forme de poudre, finement broyé a été déposé sur une plaque de silicium avec quelques gouttes d'éthanol. Le scan est réalisé sur l'intervalle  $2\theta = [20 - 75^\circ]$  avec un pas de  $0.0334^\circ$  et un temps de comptage par point de 1400 s. La référence cristalline pour estimer l'élargissement instrumental des pics est le standard NAC  $\text{Na}_2\text{Ca}_3\text{Al}_2\text{F}_{14}$

#### 3.1.2.2. Protocole pour nano-ZnS nues série 1, série 2, nano-ZnS avec MO

À l'APS (nano-ZnS nues série 2 et nano-ZnS avec MO) sur la ligne 11-ID-B. Dans ce cas, la source de rayons X était le rayonnement synchrotron. L'énergie est contrôlée par un monochromateur Si(311) et a été fixée à 58.66 keV ( $\lambda = 0.2114 \text{ \AA}$ ). L'échantillon a été introduit dans un capillaire en kapton et le signal a été enregistré sur un détecteur 2D en silicium placé à 70 cm de l'échantillon. Puis, le signal 1D en fonction de  $2\theta$  est extrait à partir de l'image à l'aide du logiciel Fit2D après une calibration avec une référence d'oxyde de cérium. Le signal correspondant au kapton seul a été soustrait au signal de l'échantillon. La référence cristalline est un échantillon de  $\text{CeO}_2$ .

#### 3.1.2.3. Calcul de la taille

La formule de Sherrer (Birks et Friedman, 1946) est utilisée pour déterminer la taille des cristallites dans l'orientation spécifique du pic de diffraction:

$$Taille = k * \frac{\lambda}{\sqrt{(\varepsilon_{exp}^2 - \varepsilon_{instu}^2) * \cos \frac{2\theta}{2}}}$$

Avec

$k$ : un facteur de correction qui tient compte de l'hétérogénéité de tailles de l'échantillon et de la morphologie des particules. Ce facteur est fixé à 0.9 dans la thèse

$\lambda$ : longueur d'onde utilisée pour la mesure

$\varepsilon_{exp}$ : largeur à mi-hauteur du pic du diffractogramme de l'échantillon

$\varepsilon_{instru}$ : largeur à mi-hauteur d'un pic du diffractogramme d'une référence cristalline.

$2\theta$ : angle de diffraction du pic de diffraction

Pour déterminer la largeur à mi-hauteur des pics de diffraction, le logiciel HighScorePlus (T. Degen *et al.*, 2014) a été utilisé pour modéliser. Le bruit de fond est défini manuellement par une ligne correspondant à la base des pics de diffractions puis soustrait. La position des pics est définie manuellement selon la position des pics de la sphalérite. Puis, les pics de diffractions sont modélisés avec des fonctions Pseudo-Voigt (combinaison linéaire des composantes Gaussiennes et Lorentziennes des pics). Cette modélisation permet d'obtenir la largeur à mi-hauteur des pics.

Pour les nano-ZnS, les pics de diffraction sont larges et se recouvrent (Figure 6). Ainsi, il est difficile d'obtenir la largeur à mi-hauteur des pics recouvrant deux pics. C'est pourquoi en général dans la thèse, le pic correspondant au plan de diffraction (220) est utilisé. Le background est défini de façon arbitraire et la modélisation est plus ou moins bonne selon la définition initiale des pics de diffraction pour les pics recouvrant deux pics. Quatre modélisations ont été effectuées sur le diffractogramme de la nano-ZnS-cys en définissant le background et les pics de diffractions de différentes manières : l'écart entre les tailles de cristallites déterminées par ces 4 manières représente l'erreur sur la taille des cristallites vis-à-vis de la modélisation du diffractogramme. L'erreur est donc de 3%.

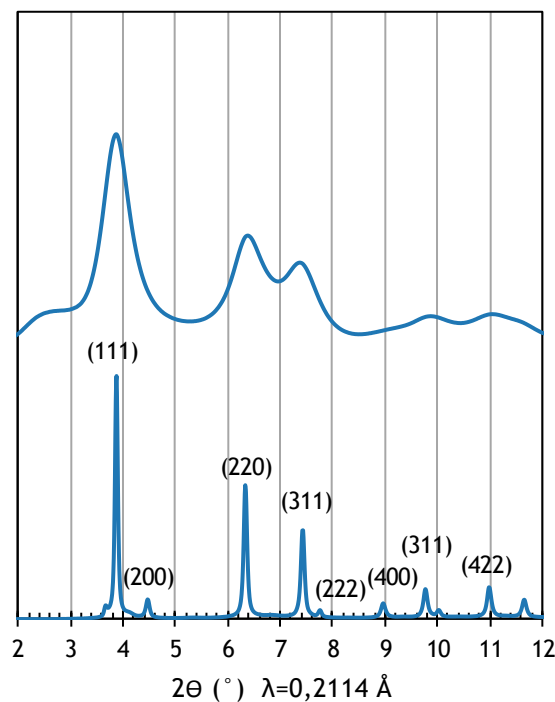


Figure 6 : Comparaison de diffractogrammes d'une nano-ZnS synthétisée (en haut) et d'une nano-ZnS commerciale (en bas)



### 3.1.3. Spectroscopie d'Absorption des rayons X (SAX)

Cette technique permet de déterminer la spéciation d'un élément, le Zn dans le cadre de cette étude, présent dans un échantillon naturel (sol, PRO) ou de synthèse (suspensions de nano-ZnS synthétisées). C'est une sonde chimique locale qui renseigne sur l'environnement atomique de l'élément cible (nature, nombre des atomes voisins sur un rayon de 4-5 Å et la distance entre l'atome absorbeur et ces atomes voisins).

#### 3.1.3.1. Principe

La spectroscopie d'absorption des rayons X correspond à l'excitation des électrons de niveau de cœur provoqué par l'absorption d'un photon d'énergie  $h\nu$  (avec  $h$  la constante de Planck et  $\nu$  la fréquence du photon). La méthode consiste à mesurer le coefficient d'absorption des rayons X ( $\mu$ ) d'un échantillon en fonction de l'énergie du rayonnement incident ( $E$ ). Cette absorbance est définie par la loi de Beer-Lambert :

$$\mu(E) \cdot x = \ln(I_0/I_t)$$

Avec

$\mu$ : coefficient d'absorption

$E$ : énergie du faisceau incident

$x$ : l'épaisseur de l'échantillon

$I_0$  : intensité du faisceau incident

$I_t$ : intensité du faisceau transmis

Pour des systèmes où l'élément excité est majoritaire, le mode de détection utilisé est la transmission. Le coefficient d'absorption total de l'échantillon se calcule à l'aide de l'équation précédente. En revanche, pour des systèmes où l'élément excité est minoritaire, le mode de détection utilisé est la fluorescence X, l'intensité d'un pic de référence étant directement proportionnelle à l'absorption de l'élément sélectionné au seuil considéré. Le coefficient d'absorption de cet élément est alors calculé par l'équation suivante:

$$\mu(E) = \ln(I_f/I_0)$$

Avec

$I_f$ : intensité de fluorescence

Selon l'énergie du photon incident, différents processus physiques conduisent à différentes structures sur le spectre d'absorption des rayons X. La Figure 7 représente un spectre d'absorption enregistré au seuil k du Zn pour une nano-ZnS et les différents processus mis en jeu.

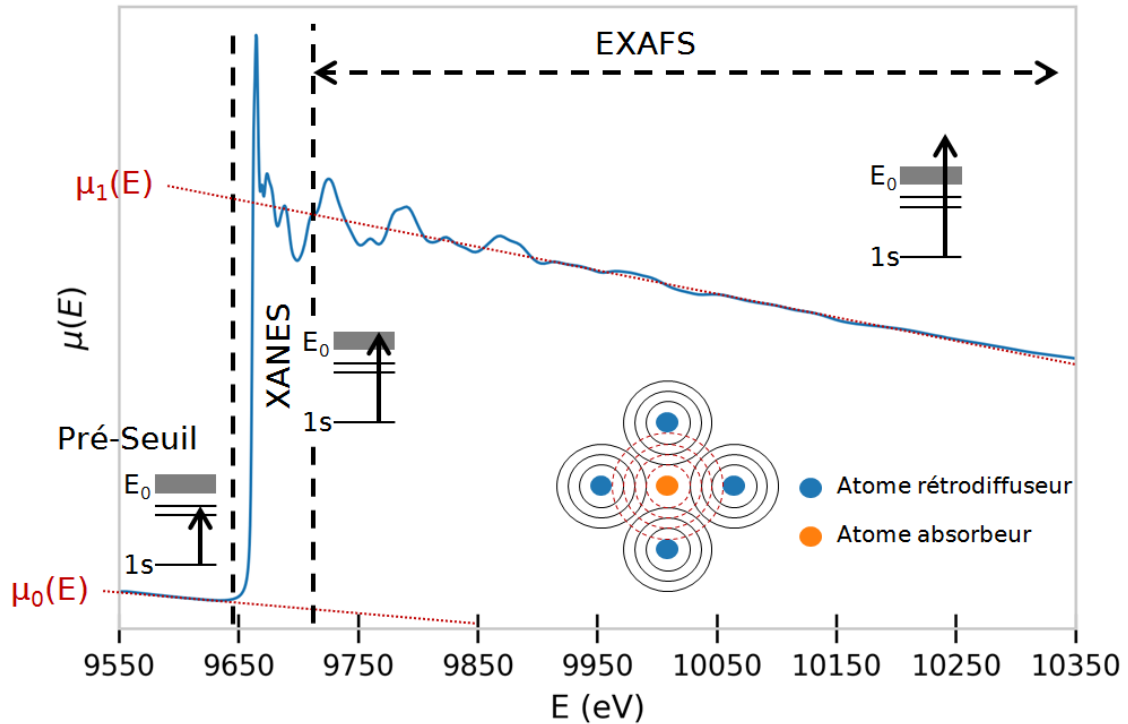


Figure 7 : Spectre d'absorption des rayons X au seuil du Zinc

Le spectre est généralement décrit en 3 parties.

**La région du préseuil:** dans cette zone, l'énergie du photon incident ( $E$ ) est nettement inférieure à l'énergie d'ionisation ( $E_0$ , niveau de Fermi) et ne permet pas l'excitation des électrons de l'élément étudié. En transmission, le coefficient d'absorption provient des autres éléments de l'échantillon et décroît de façon monotone. En fluorescence, le coefficient d'absorption de l'élément au seuil considéré est proche de 0. Cette région, notée  $\mu_0(E)$ , correspond au fond continu et est considéré comme la ligne de base.

**La région du seuil ou XANES** (X-ray Absorption Near Edge Structure): cette zone s'étend jusqu'à 50 eV après le seuil et renseigne sur le degré d'oxydation et la symétrie de l'atome cible. Pour  $E$  inférieur mais proche de  $E_0$ , l'électron passe de son état fondamental à un état électronique excité juste en dessous de l'énergie de Fermi. Cette énergie peut être suffisante pour qu'un électron transite vers les premiers niveaux vides ou partiellement remplis. Ce phénomène peut se traduire par l'apparition d'un prépic avant le seuil. Pour  $E_0 < E < E_0 + 50$  eV, l'électron est éjecté vers le continuum avec une énergie cinétique faible et un libre parcours moyen (distance parcourue sans perte d'énergie) très grand. Le photoélectron est alors impliqué dans de nombreux phénomènes de diffusion multiple avec les atomes voisins. Ces structures près du seuil renseignent sur la coordinance de l'atome absorbeur.

**La région EXAFS** (Extended X-ray Absorption Fine Structure): dans cette zone  $E_0 + 50$  eV  $< E < E_0 + 1000$  eV et l'électron de cœur est éjecté vers les états du continuum. L'énergie cinétique étant importante et le libre parcours moyen plus faible, le photoélectron est

essentiellement impliqué dans des phénomènes de diffusion simple avec les atomes voisins. Le spectre d'absorption présente deux composantes : une fonction lentement décroissante notée  $\mu_1(E)$  et une fonction oscillante autour de  $\mu_1(E)$ . L'onde qui est associée à ces photoélectrons va être rétrodiffusée par les atomes de la sphère de coordination de l'atome central et interfère avec l'onde émergente. Cela donne lieu aux oscillations EXAFS dont l'étude permet de caractériser la nature et le nombre des voisins de l'atome cible, les distances entre l'atome absorbeur et les atomes voisins et le désordre structural au sein d'un échantillon.

### 3.1.3.2. Formalisme EXAFS

L'équation EXAFS dans le formalisme d'onde sphérique de diffusion simple (c'est à dire seuls les trajets aller-retour de l'électron de l'atome absorbeur vers chacun de ses voisins sont pris en compte) s'écrit:

$$\chi(k) = - \sum_{i=1}^N \frac{N_i S_0^2}{k R_i} |f_i(\theta, k, R_i)| e^{-2\sigma_i^2 k^2} e^{\frac{2R_i}{\lambda(k)}} \sin(2kR_i + \phi_i(k) + 2\delta_c(k))$$

Avec

$k$ : Module du vecteur d'onde du photoélectron défini par  $k = \sqrt{(h\nu - E_0) \frac{2m_e}{\hbar^2}}$  avec  $m_e$  la masse de l'électron,  $E_0$  l'énergie du photon incident et  $h\nu$  l'énergie d'ionisation de l'élément absorbant.

$|f_i(\theta, k, R_i)|$ : fonction d'amplitude de rétrodiffusion de l'atome  $i$  selon l'angle par rapport à la direction de l'onde incidente.

$N_i$ : Nombre de voisins de type  $i$

$R_i$ : distance atome absorbeur - atome voisin

$2\sigma_i$ : Facteur Debye-Waller comprenant les termes de désordre structural (distribution des distances) et de désordre dynamique (agitation thermique)

$\lambda(k)$ : libre parcours moyen du photoélectron éjecté

$S_0^2$ : terme lié aux effets multi-électroniques

$\delta_c(k)$ : fonction de déphasage induite par la traversée du potentiel de l'atome central

$\phi_i(k)$ : fonction de déphasage de l'atome rétrodiffuseur

Dans cette équation, la fonction sinus traduit l'interférence entre l'onde incidente et l'onde rétrodiffusée. Chaque paire atomique (ou chemin de diffusion simple) engendrant une sinusoïde intervient dans l'équation par l'intermédiaire du signe somme. La fréquence des oscillations dépend de la distance interatomique et de la nature des voisins. L'amplitude des oscillations est liée au nombre de voisins, à leur distance et à leur nature et à la densité électronique de l'élément rétrodiffuseur. Plus la densité électronique sera forte, plus son amplitude de rétrodiffusion sera grande.

### 3.1.3.3. Mise en œuvre expérimentale

La mesure du coefficient d'absorption des rayons X nécessite un flux de photons incident important, dont l'énergie peut varier de manière continue de manière continue sur un large domaine énergétique. Le rayonnement synchrotron est la radiation électromagnétique émise par les électrons circulants à des vitesses quasi-relativistes (1 à 6 GeV). Les électrons circulent dans un anneau de stockage. Un rayonnement X très brillant est émis lorsque ces particules sont déviées sous l'influence d'un champ magnétique. Les propriétés du rayonnement synchrotron dépendent principalement du courant et de l'énergie du faisceau d'électrons dans l'anneau de stockage ainsi que des dispositifs d'insertion. Une ligne de lumière dédiée à l'absorption X est principalement composée d'un monochromateur (sélectionnant une longueur d'onde dans le spectre continu du rayonnement synchrotron selon la loi de Bragg), de miroirs (rejetant les longueurs d'onde harmoniques), de fentes (limitant la taille du faisceau) et des détecteurs (mesurant les intensités  $I_0$ ,  $I_1$  et  $I_2$  et  $I_f$ ) (Figure 8).

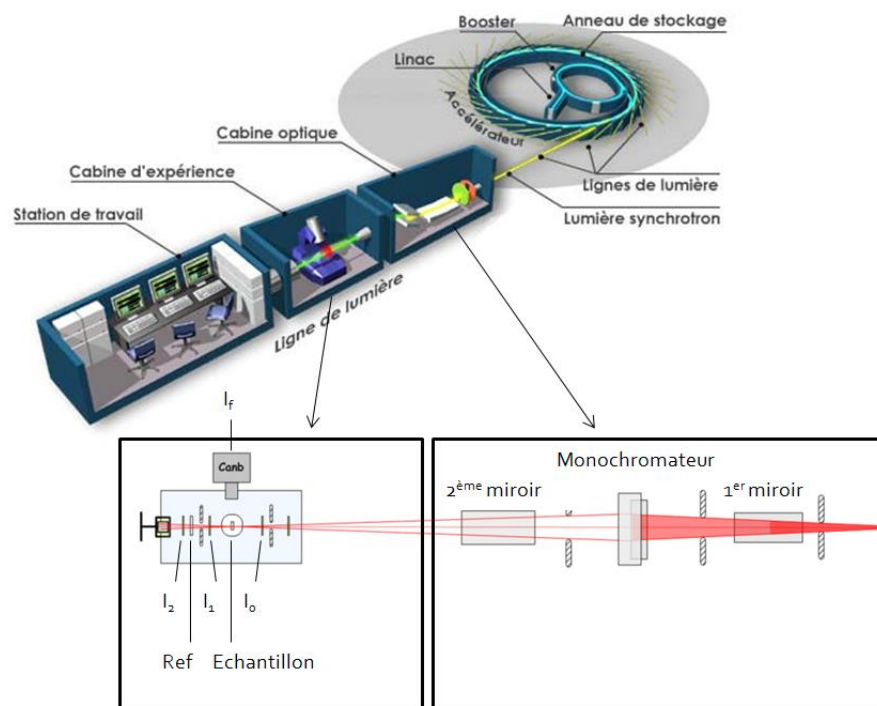


Figure 8 : Schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à l'absorption des rayons X, exemple du montage de la ligne FAME à l'ESRF ([www.esrf.fr](http://www.esrf.fr) et [www.synchrotron-soleil.fr](http://www.synchrotron-soleil.fr))

Pour la thèse, les spectres XAS ont été enregistrés au seuil K du Zn sur différentes lignes de lumière, chacune spécialisée pour l'analyse d'échantillon dilués (voir Tableau 4).

Tableau 4 : Lignes de lumière utilisées

Ligne de lumière	Synchrotron
FAME	ESRF, Grenoble, France
11.2	SSRL, Stanford, Etats Unis

3.1.3.4. *Traitement du signal*

L'enregistrement d'un signal en absorption des rayons X ne donne pas directement aux spectres XANES et EXAFS. Une étape préliminaire de normalisation (pour le XANES) et également d'extraction (pour l'EXAFS) est nécessaire. Ce traitement ainsi que l'affinement des spectres EXAFS a été réalisé à l'aide des logiciels Athena et Artemis de la suite Demeter (Ravel et Newville, 2005). La Figure 9 présente l'organigramme de la procédure de traitement et d'affinement des spectres XAS.

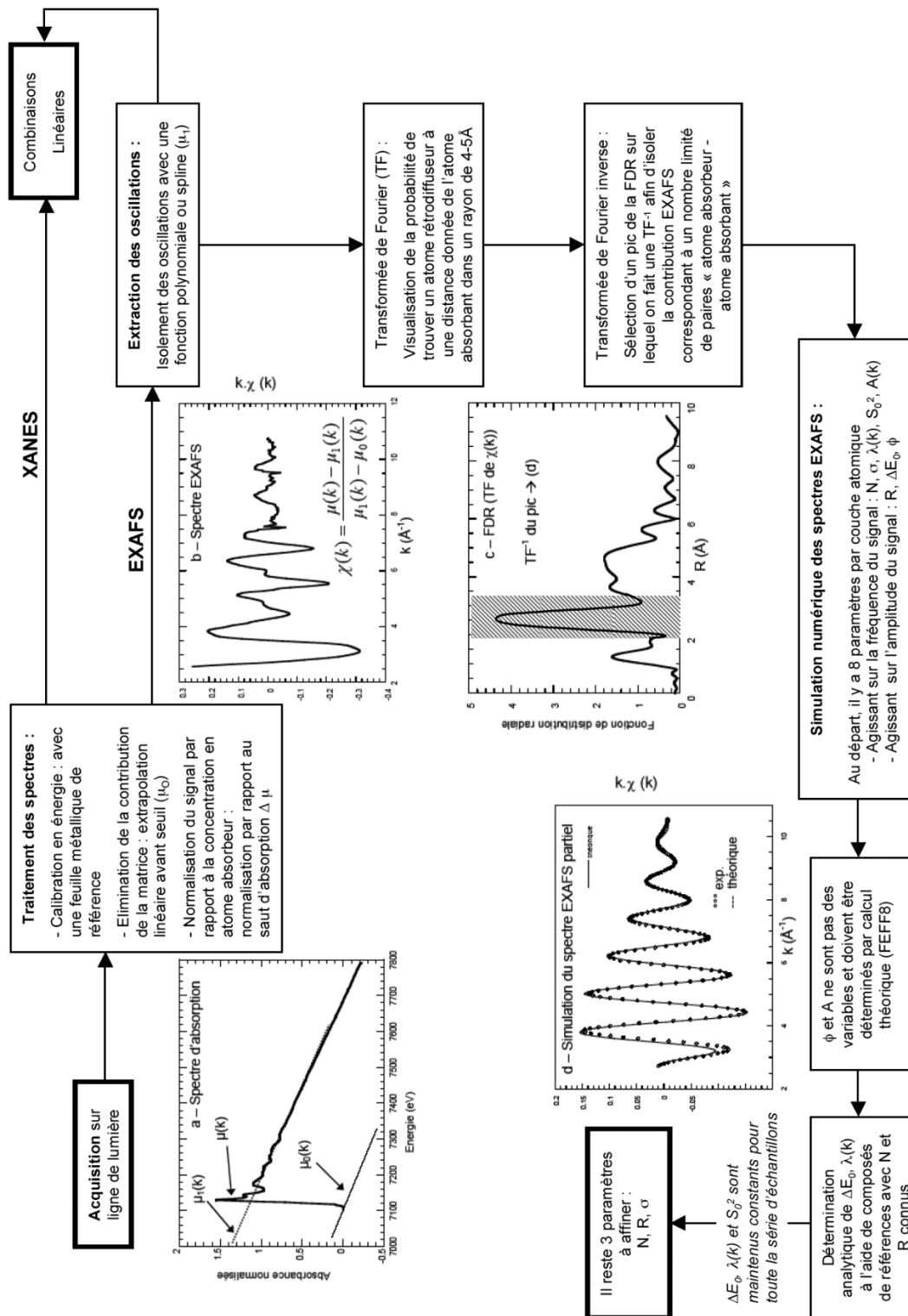


Figure 9 : Organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS, d'après Auffan (2007).

### 3.1.4. Diffusion totale des rayons X aux grands angles et analyse par fonction PDF

La fonction PDF (Pair Distribution Function en anglais et Fonction de Distribution de Paires en français) est obtenue par transformation de Fourier du signal de diffusion totale corrigé et normalisé. La mesure de diffusion totale des rayons X (ou de neutrons) se fait aux grands angles puis une étape d'extraction du signal est nécessaire pour obtenir une fonction dans l'espace réel. Chaque pic de la fonction PDF correspond à une probabilité de trouver deux atomes séparés de la distance correspondante. Cette technique présente un intérêt pour caractériser la structure de composés très petits et cristallisés à de courtes distances, tels que les nanoparticules. Dans notre cas, la loi de Bragg et la caractérisation par DRX atteint ses limites car la loi de Bragg suppose une périodicité de la maille cristalline. Les particules synthétisées lors de cette étude ont un diamètre équivalent à 4-5 mailles. L'élargissement des pics de diffraction étant lié au désordre et à la petite taille des particules, leur analyse devient trop complexe pour des tailles inférieures à 3-4 nm (recouvrement des pics).

#### 3.1.4.1. Principe

La fonction PDF,  $G(r)$ , peut être calculée à partir d'un modèle structural selon la formule :

$$G(r) = \frac{1}{r} \sum_i \sum_j \left[ \frac{b_i b_j}{\langle b \rangle^2} \delta(r - r_{ij}) \right] - 4\pi\rho_0$$

La somme est propagée sur l'ensemble des atomes  $i$  et  $j$  dans le modèle structural, avec

$r_{ij}$  : distance dans les 2 atomes  $i$  et  $j$

$b_i, b_j$  : facteurs de diffusion atomiques des atomes  $i$  et  $j$

$\langle b \rangle$  : le facteur de diffusion atomique moyen de l'échantillon

$\rho_0$  : densité numérique du composé, c'est-à-dire le nombre d'atomes par unité de volume

Selon cette dernière équation, la fonction  $G(r)$  présente des pics pour des valeurs de  $r$  correspondant à des distances interatomiques dans le composé et l'intensité des pics est proportionnelle au produit des facteurs de diffusion atomique formant la paire. Les contributions de chaque paire d'atomes du composé s'ajoutent. La largeur des pics dépend de la distribution des distances autour d'une valeur moyenne, soit à cause des vibrations thermiques ou d'une distribution statistique (désordre) (Bordet, 2008).

Expérimentalement, la fonction PDF s'obtient à partir d'un diffractogramme selon la formule :

$$G(r) = 4\pi[\rho(r) - \rho_0] = \frac{2}{\pi} \int_0^\infty Q[S(Q) - 1] \sin(Qr) dQ$$

Avec

$\rho(r)$  : la densité de paires atomiques

$S(Q)$  : la fonction de structure totale, c'est-à-dire l'intensité diffusée corrigée et normalisée.

$Q$  : l'amplitude du vecteur de diffusion  $Q$

Pour la diffusion élastique, le vecteur de diffusion  $Q$  a une amplitude de:

$$|Q| = 4\pi \sin\theta / \lambda$$

Avec

$\lambda$ : la longueur d'onde des photons

$\theta$ :  $2\theta/2$ , avec  $2\theta$  l'angle entre le faisceau incident et le faisceau diffracté.

$S(Q)$  s'obtient à partir de la section efficace de diffusion  $\frac{d\sigma_c}{d\Omega}$ , avec  $d\Omega$  l'angle solide entre le détecteur et l'échantillon :

$$S(Q) = \frac{\frac{d\sigma_c}{d\Omega} \langle b \rangle^2 - \langle b^2 \rangle}{\langle b \rangle^2}$$

La section efficace de diffusion s'obtient à partir de l'intensité ( $I_c$ ) de diffusion cohérente après normalisation selon la formule :

$$I_c = APC \frac{d\sigma_c}{d\Omega}$$

Avec

$A$  : facteur d'absorption qui dépend de la géométrie et de la nature de l'échantillon

$P$  : facteur de polarisation des rayons X

$C$  : facteur de normalisation pour exprimer la section efficace dans l'unité d'intensité par atome. (Egami et Billinge, 2012)

Finalement, l'intensité cohérente s'obtient après correction du signal de diffusion totale des rayons X. En effet, l'intensité totale ( $I_T$ ) de la diffusion des rayons X peut être séparée en différentes parties:

$$I_T = I_c + I_{IC} + I_{MC} + I_{BG}$$

Avec

$I_c$ : l'intensité de diffusion cohérente

$I_{IC}$  : l'intensité de diffusion non cohérente

$I_{MC}$ : intensité de diffusion multiple

$I_{BG}$ : l'intensité de diffusion due à l'environnement de mesure (background)



La diffusion non cohérente correspond à la diffusion de Compton. La diffusion multiple a lieu principalement au sein de l'échantillon mais la double diffusion impliquant l'échantillon et son environnement peut être significative. L'intensité de diffusion due à l'environnement de mesure (background: porte-échantillon, air, systèmes d'optique...) correspond à la diffusion ayant lieu sans l'échantillon.

Dans le contexte de l'analyse PDF, le background n'a rien à voir avec le background défini lors de l'analyse du signal DRX. En effet, le background en DRX correspond à l'intensité sous les pics de Bragg et comprend l'intensité de diffusion. Cependant, cette intensité de diffusion contient toute l'information liée à l'ordre local. L'information sur la structure et les dynamiques du réseau cristallin est contenue dans l'intensité due à la diffusion cohérente (Egami et Billinge, 2012).

#### 3.1.4.2. Mise en œuvre expérimentale

L'intensité de diffusion totale peut s'obtenir à partir d'un faisceau de rayons X ou de neutrons. Dans le cadre de la thèse, la diffusion des rayons X donc la suite des explications sous-entend une mesure par rayons X. Pour obtenir une bonne résolution des pics de la PDF et un rapport signal sur bruit satisfaisant aux hautes valeurs de  $r$ , il est nécessaire d'enregistrer le signal sur une large gamme de  $Q$ .

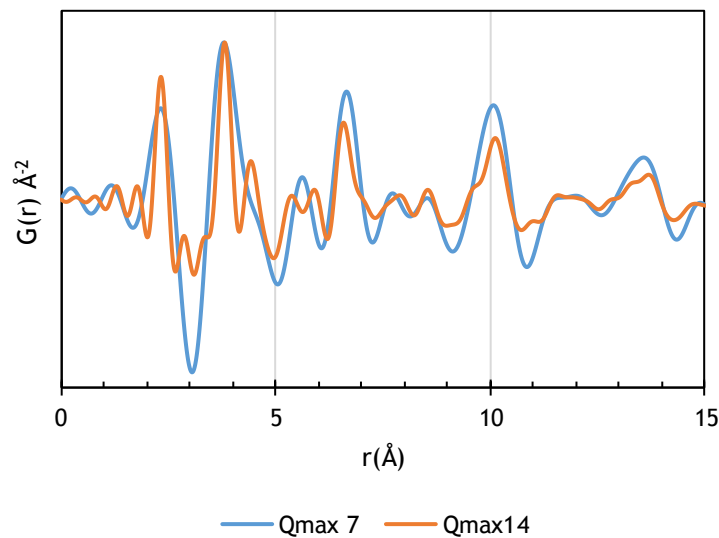


Figure 10 : Comparaison de deux fonctions PDF extraites sur deux intervalles de  $Q$  différents :  $[0;7]$  et  $[0;14] \text{ \AA}^{-1}$  pour les courbes bleues et oranges respectivement.

C'est pourquoi le rayonnement synchrotron est utilisé pour la mesure : l'énergie du faisceau de rayons X est très élevée (environ 90 keV), donc la longueur d'onde est très faible ( $0.143 \text{ \AA}$ ). L'une des façons d'obtenir le signal de diffusion est de le mesurer sur un détecteur 2D placé le plus proche possible de l'échantillon afin d'obtenir la diffusion aux grands angles afin de maximiser le vecteur  $Q_{\text{max}}$ .

L'échantillon sous forme de poudre est placé dans un capillaire en kapton. Pour chaque mesure, un capillaire vide est mesuré (mesure de  $I_{BG}$ ), ainsi qu'une référence cristalline.

#### 3.1.4.3. Traitement du signal

La première étape consiste à transformer le signal de diffusion 2D en signal 1D à partir de l'image de diffusion (Figure 11). Le logiciel utilisé est le logiciel fit2D (Hammersley *et al.*, 1996). Le logiciel permet

- d'appliquer un masque sur l'image pour ne pas intégrer certains points de l'image (beamstop par exemple qui permet de protéger le détecteur du faisceau direct) (Figure 11),
- de calibrer les données, c'est-à-dire redéfinir les informations de géométrie par rapport à la référence cristalline (par ex. distance échantillon-détecteur, centre de l'image, position du détecteur..),
- d'intégrer le signal en fonction de la distance échantillon-détecteur, de la longueur d'onde de mesure et des informations de géométrie par rapport au faisceau.

Lors de l'extraction sur fit2D, le facteur de polarisation des rayons X (0.95) est considéré. Le signal obtenu est l'intensité de diffusion en fonction de  $2\theta$  ou de  $Q$  (Figure 12).

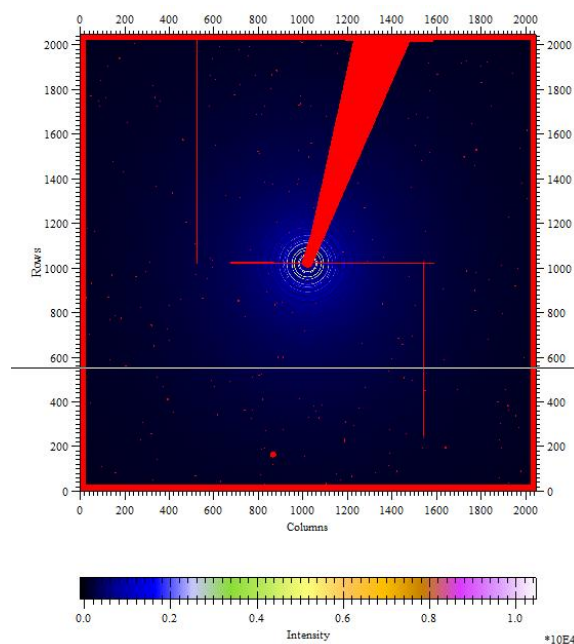


Figure 11 : Traitement du signal de diffusion totale des rayons X sur fit2D

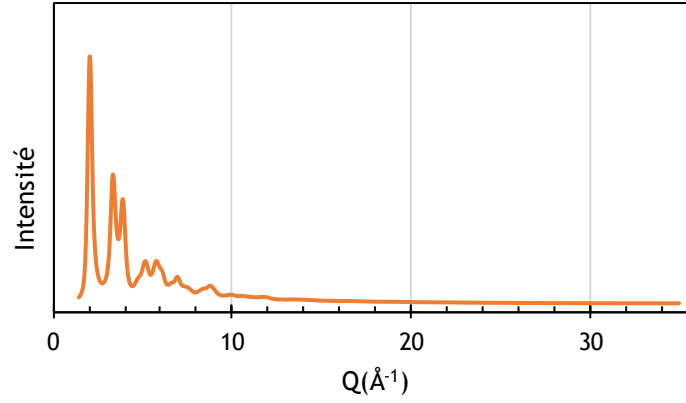


Figure 12 : Signal d'intensité de diffusion des rayons X en fonction de  $Q$  pour l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2)

La deuxième étape consiste à extraire la fonction PDF du signal de diffusion totale. Le logiciel PDFgetX3 permet de filtrer le signal de diffusion totale pour obtenir uniquement l'intensité cohérente qui contient les informations de structure (Juhás *et al.*, 2013). Après soustraction du signal du background mesuré, l'intensité totale mesurée est considérée selon l'équation

$$I_T(Q) = a(Q)I_c(Q) + b(Q)$$

Avec

$I_c$  : l'intensité cohérente

$a(Q)$ ,  $b(Q)$  corrections appliquées pour filtrer la partie de l'intensité totale qui ne contient pas d'information structurale.

Le traitement du signal d'intensité se fait en fonction de différents paramètres choisis tels que l'intervalle de  $Q$  sur lequel le signal est extrait. La fonction  $S(Q)$  correspond à l'intensité cohérente normalisée par le facteur de diffusion de l'échantillon. La fonction PDF  $G(r)$  est la transformée de Fourier de  $Q(S(Q) - 1)$  ( $F(Q)$ ) selon l'équation de  $G(r)$ .

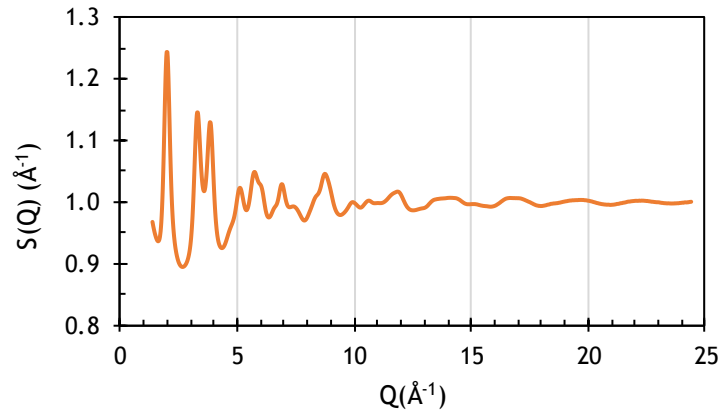


Figure 13 : Fonction  $S(Q)$  de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2)

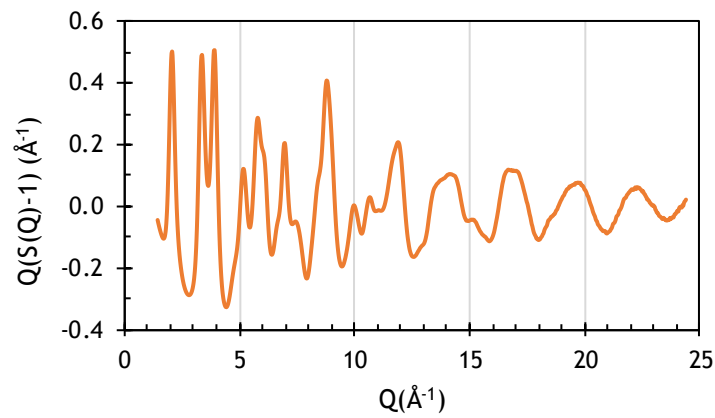


Figure 14 : Fonction  $F(Q)$  de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2)

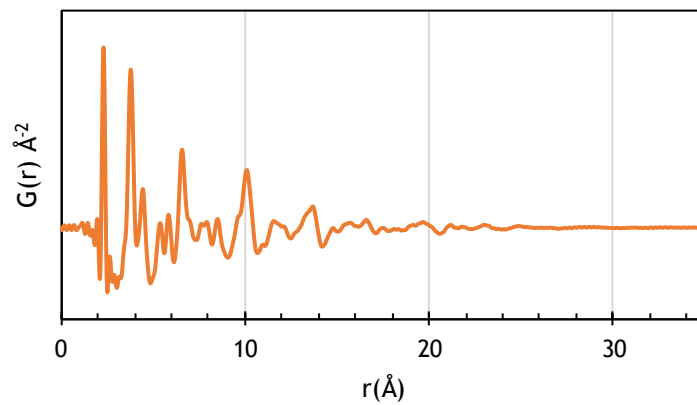


Figure 15 : Fonction PDF de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2)

Une fois extraite, un certain nombre de paramètres structuraux peuvent être modélisés par une analyse de type Rietveld. PDFgui est un logiciel qui permet de modéliser la fonction PDF (Farrow *et al.*, 2007) à partir de la structure théorique de la sphalérite et en faisant varier différents paramètres tels que :

- Taille du cluster,
- Paramètre de maille,
- Facteurs de déplacements atomiques (isotropiques ou anisotropiques),
- Facteur de déplacement corrélé des atomes.

Pour déterminer l'erreur sur la valeur des paramètres issue de la modélisation, 3 modélisations ont été effectuées sur chaque fonction PDF avec des valeurs initiales différentes. Ainsi, 3 solutions différentes ont été trouvées avec des valeurs cohérentes pour les paramètres du modèle et une qualité de modélisation acceptable (c'est-à-dire que tous les pics de la fonction PDF sont considérés par le modèle et  $R < 0.3$ ).

Le résidu  $R$  est calculé selon la formule :

$$R_w = \sqrt{\frac{\sum_{i=1}^N w(r_i) [G_{obs}(r_i) - G_{calc}(r_i)]^2}{\sum_{i=1}^N w(r_i) G_{obs}^2(r_i)}}$$

Avec

$w(r_i)$  : un facteur multiplicatif donné à chaque point

$G_{obs}(r_i)$  : la fonction PDF expérimentale

$G_{calc}(r_i)$  : la fonction PDF modélisée

## 3.2. Caractérisation chimique

### 3.2.1. ICP-AES

La technique d'ICP-AES, spectroscopie d'émission atomique couplée à une torche plasma, a été utilisée pour déterminer la concentration en Zn au cours du temps lors de l'expérience de dissolution des nano-ZnS en fonction de leur taille.

L'ICP (Inductively Coupled Plasma) est basée sur la transformation de l'échantillon en aérosol liquide à l'aide d'argon gazeux. Cet aérosol est dirigé vers une torche à plasma (6000-8000 K), qui vaporise, dissocie, atomise et ionise les éléments. La température élevée du plasma a pour effet d'exciter les électrons vers un niveau d'énergie supérieur. Lors de leur retour à l'état stable, les électrons émettent une série d'ondes électromagnétiques, dont la longueur d'onde est spécifique à chaque élément. L'intensité de cette émission est proportionnelle à la concentration de l'élément, analysée par un spectromètre d'émission optique et quantifiée par des capteurs CCD (Charged Coupled Device). Dans le cadre de la thèse, l'ICP-AES Perkin Elmer 4300 DV a été utilisée.

Pour chaque série de mesure, un standard de justesse (EnviroMAT Eau souterraine, Haute ES-H-2) avec une concentration en Zn certifiée est également dosé tous les 15 échantillons. Cette mesure permet de déterminer l'incertitude de la mesure et de

contrôler la dérive de la mesure dans le temps. Pour chaque échantillon, la mesure est effectuée 3 fois.

### 3.2.2. ICP-MS

#### 3.2.2.1. Principe et utilisation

L'ICP-MS, spectromètre de masse couplé à une torche plasma, fonctionne sur le même principe que l'ICP-AES en ce qui concerne l'ionisation de l'échantillon par une torche plasma. Le spectromètre de masse sépare les ions issus de l'ionisation des atomes dans la torche à plasma selon leur rapport masse/charge, spécifique à chaque isotope. Cette technique, plus sensible, permet de quantifier des éléments à l'état de traces ( $\mu\text{g/L}$ ) comme dans la solution de sol, mais aussi de distinguer les différents isotopes du Zn, ce qui permet de déterminer la concentration en  $^{68}\text{Zn}$  dans les éluions de résine de DGT. Pour ces deux objectifs, l'ICP-MS NexION 300x (Perkin Elmer) a été utilisé au CEREGE. Cependant, les paramètres seront différents:

- Pour une quantification de traces, le but est de maximiser la sensibilité. Ainsi, le détecteur mesure l'intensité du faisceau d'ions pendant 15 cycles de 50 ms. Le signal peut varier légèrement et est moyenné sur la durée de 50 ms. De plus, la cellule de réaction n'est pas utilisée afin de maximiser la sensibilité de la mesure.
- Pour une mesure de rapports isotopiques, la cellule de réaction est utilisée pour injecter un gaz d'hélium à 0.2 mL/min afin de maintenir le faisceau d'ions au centre de la cellule et éviter la divergence des quatre isotopes mesurés. Puis, la durée de mesure de l'intensité du faisceau est diminuée de 1 à 5 ms (selon l'abondance de l'isotope) afin de scanner rapidement tous les isotopes et limiter des variations de signal dans le temps. Pour améliorer la précision de l'analyse, 100 cycles de mesures sont effectués (au lieu de 15 dans la méthode du dosage du Zn).

#### 3.2.2.2. Calcul de la concentration en Zn provenant des nano- $^{68}\text{ZnS}$

Pour déterminer la concentration en Zn provenant des nano-ZnS synthétisées à partir d'un sel enrichi en  $^{68}\text{Zn}$ , on utilise la méthode de la dilution isotopique. Cette méthode consiste à ajouter un traceur (souvent un enrichi en un isotope rare, ici ce sont les nano- $^{68}\text{ZnS}$ ) dans un échantillon à analyser. On obtient un mélange constitué de l'échantillon naturel et du traceur. Le but du calcul est de déterminer la composition en Zn provenant du traceur (nano- $^{68}\text{ZnS}$ ),  $\text{Zn}_{\text{tr}}$  et en Zn naturel ( $\text{Zn}_{\text{nat}}$ ) dans le mélange.

##### (i) Corrections

A partir des intensités en  $^{66}\text{Zn}$  et en  $^{68}\text{Zn}$ , les rapports 68/66 sont calculés et corrigés du blanc. La correction consiste à retirer aux valeurs d'intensité la valeur d'intensité obtenue dans l'acide ( $\text{HNO}_3$ , VWR trace metal analysis) 2% seul, ce qui permet de s'affranchir des interférences isobariques. En effet, le signal de  $^{68}\text{Zn}$  est interféré par le

signal de l'argon du plasma ( $^{40}\text{Ar}$ ) et de l'azote de l'air ( $^{14}\text{N}_2^+$ ). Donc pour chaque échantillon mesuré,  $(\frac{68}{66})_{norm}$  est calculé :

$$(\frac{68}{66})_{norm} = \frac{Int_{ech}^{68} - \overline{Int_{blc}^{68}}}{Int_{ech}^{66} - \overline{Int_{blc}^{66}}}$$

Avec

$Int_{ech}^{68}$  et  $Int_{ech}^{66}$  les intensités correspondant aux masses 68 et 66, respectivement, pour l'échantillon

$\overline{Int_{blc}^{68}}$  et  $\overline{Int_{blc}^{66}}$  la moyenne des intensités correspondant aux masses 68 et 66, respectivement, pour l'ensemble des blancs mesurés.

Le biais de masse instrumental est généré lors de la circulation du faisceau d'ions. Des collisions interatomiques ont lieu lors de l'excitation vibrationnelle des ions dans le plasma. Ces chocs engendrent une expulsion préférentielle des isotopes légers, la concentration en isotopes légers est donc sous-estimée. Le rapport 68/66 mesuré ( $R_{mes}$ ) est donc supérieur au rapport réel ( $R_{réel}$ ). Le biais de masse (BM) s'exprime selon l'équation suivante à partir des rapports R corrigés du blanc et des masses molaires du  $^{68}\text{Zn}$  (67.9) et du  $^{66}\text{Zn}$  (65.9):

$$BM = \frac{\ln(\frac{R_{mes}}{R_{réel}})}{\ln(\frac{67.9}{65.9})}$$

Le biais de masse peut être calculé sur des échantillons contenant uniquement du Zn naturel avec le rapport réel naturel de 0.67 calculé d'après les abondances naturelles du Zn (voir Tableau 5). Tous les 5 échantillons mesurés, une solution contenant uniquement du Zn naturel est mesurée. Le biais de masse pour ces 5 échantillons est calculé à partir de la moyenne des rapports mesurés pour les échantillons naturels entourant ces 5 échantillons.

Puis le rapport mesuré est corrigé du biais de masse par la relation suivante :

$$R_{réel} = \frac{R_{mes}}{(\frac{67.9}{65.9})^{BM}}$$

Puis, les étapes de calculs suivantes considèrent uniquement le rapport des intensités 68/66 corrigé du blanc et du biais de masse et est désigné par R.

Tableau 5 : Abondance de chaque isotope stable du Zn dans le Zn naturel, le Zn du traceur en théorie et le Zn du traceur d'après la mesure

Isotope	Zn naturel	Zn du traceur (théorique)	Zn du traceur (mesuré)
64	48.89	0.03	0.082
66	27.81	0.16	
67	4.11	0.62	
68	18.57	99.16	99.238
70	0.62	0.03	1210.22
68/66	0.67	619.75	

(ii) Calcul de la masse de Zn issu du traceur dans le mélange

L'information recherchée est la masse de Zn issue du traceur dans le mélange (soit l'échantillon mesuré). Pour l'obtenir, nous partons de l'expression suivante :

$$R_{\text{mélange}} = \left( \frac{Int^{68}}{Int^{66}} \right)_{\text{mélange}} = \frac{Int_{tr}^{68} + Int_{nat}^{68}}{Int_{tr}^{66} + Int_{nat}^{66}}$$

Avec

$Int^{68}$  et  $Int^{66}$  désignant respectivement l'intensité du signal 68 et 66 correspondant au nombre d'atome de chaque isotope du Zn.

Les indices *tr* et *nat* désignent les signaux correspondant au Zn du traceur et au Zn naturel, respectivement.

$$R_{\text{mélange}} = \frac{Int_{tr}^{66} * \left( \frac{Int^{68}}{Int^{66}} \right)_{tr} + Int_{nat}^{66} * \left( \frac{Int^{68}}{Int^{66}} \right)_{nat}}{Int_{tr}^{66} + Int_{nat}^{66}}$$

$$R_{\text{mélange}} = \frac{Int_{tr}^{66} * R_{tr} + Int_{nat}^{66} * R_{nat}}{Int_{tr}^{66} + Int_{nat}^{66}}$$

Avec

$R_{tr}$  : le rapport des intensités 68/66 pour le traceur

$R_{nat}$  : le rapport des intensités 68/66 pour les échantillons naturels

$$Int_{tr}^{66} * (R_{\text{mélange}} - R_{tr}) = Int_{nat}^{66} * (R_{nat} - R_{\text{mélange}})$$



L'intensité, soit le nombre d'atomes, est exprimée selon la masse de Zn du traceur et de Zn naturel :

$$Int_{tr}^{66} = \frac{m(Zn_{tr})}{M(Zn_{tr})} * N_a * Ab_{tr}^{66}$$

$$Int_{nat}^{66} = \frac{m(Zn_{nat})}{M(Zn_{nat})} * N_a * Ab_{nat}^{66}$$

Avec

$M(Zn_{tr})$  : masse molaire du Zn du traceur : 67.8 g/mol

$M(Zn_{nat})$  : masse molaire du Zn naturel : 65.4 g/mol

$Ab_{tr}^{66}$  : abondance du  $^{66}\text{Zn}$  dans le Zn du traceur : 0.082%

$Ab_{nat}^{66}$  : abondance du  $^{66}\text{Zn}$  dans le Zn naturel : 27.81 %

$N_a$  : le nombre d'Avogadro

Ainsi, on obtient la relation suivante :

$$\frac{m(Zn_{tr})}{m(Zn_{nat})} = \frac{M(Zn_{tr})}{M(Zn_{nat})} * \frac{Ab_{nat}^{66}}{Ab_{tr}^{66}} * \frac{(R_{nat} - R_{mélange})}{(R_{mélange} - R_{tr})}$$

La masse de Zn provenant du traceur (nano- $^{68}\text{ZnS}$ ) est calculée d'après cette relation. La masse de Zn naturelle est calculée d'après l'intensité en  $^{66}\text{Zn}$  et une calibration en Zn naturel.  $R_{nat}$  est la moyenne des rapports 68/66 déterminés pour tous les échantillons naturels de la série ( $[\text{Zn}_{nat}] = 1$  à 105 ppb).  $R_{tr}$  est le rapport du traceur qui correspond à la solution de  $^{68}\text{ZnCl}_2$  préparée pour la synthèse de nano- $^{68}\text{ZnS}$  après ajustement du pH à 5.1 (paragraphe 1.1.4. ).

(iii) Mélanges Zn naturel et traceur, calibration du traceur

Des mélanges gravimétriques de Zn naturel (provenant de la solution VWR Zn 1000 ppm Plasma Emission Standard) et de traceur ont été préparés pour vérifier la mesure des rapports. Le Tableau 6 présente les erreurs déterminées pour ces mélanges. L'erreur correspond à la différence entre le rapport des masses déterminé par la mesure et le rapport théorique. Pour le calcul, les abondances des isotopes 68 et 66 sont utilisées dans le paramètre  $R_{tr}$ . Le calcul avec les abondances théoriques, fournies dans le certificat d'Isoflex, résulte sur des erreurs très importantes (58 à 84%). D'ailleurs, le rapport 68/66 mesuré pour le traceur est de 1287 et de 1211 pour la première et deuxième série de mesure, respectivement. D'après les abondances certifiées ( $^{66}\text{Zn}$  : 0.16 % et  $^{68}\text{Zn}$  : 99.16 %), le rapport 68/66 théorique est de 619. Cette différence entre le rapport mesuré et théorique peut s'expliquer par la très faible abondance de l'isotope  $^{66}\text{Zn}$  du traceur. En effet, une variation de la proportion en  $^{66}\text{Zn}$  induit une forte variation du rapport 68/66. Dans cette étude, nous avons utilisé les valeurs du traceur que nous avons calibrées. Nous avons utilisé le rapport mesuré de 1210 en considérant des abondances des isotopes 66 et 68 à 0.082 et 99.238% respectivement (abondances déterminées avec la mesure).

L'utilisation de ces valeurs donne des erreurs plus faibles pour le rapport des masses déterminées avec les mélanges gravimétriques: de 6 à 18%.

Tableau 6 : Erreur déterminée sur les mélanges de Zn naturel et de Zn traceur

	1 <sup>ère</sup> série de mesure : les sols témoins				2 <sup>ème</sup> série de mesure : les sols contenant les nano- <sup>68</sup> ZnS			
	Calculs avec abondances théoriques		Calculs avec abondances déterminées avec la mesure		Calculs avec abondances théoriques		Calculs avec abondances déterminées avec la mesure	
$\frac{m(\text{Zn tr})}{m(\text{Zn nat})}$	$\frac{m(\text{Zn tr})}{m(\text{Zn nat})_{exp}}$	Erreur (%)	$\frac{m(\text{Zn tr})}{m(\text{Zn nat})_{exp}}$	Erreur (%)	$\frac{m(\text{Zn tr})}{m(\text{Zn nat})_{exp}}$	Erreur (%)	$\frac{m(\text{Zn tr})}{m(\text{Zn nat})_{exp}}$	Erreur (%)
0.114	0.048	58	0.094	18	0.062	84	0.121	6
11.4	-	-	-	-	6.556	74	12.792	11

## Références

- Auffan, M. (2007). *Nanoparticules d'oxydes métalliques: relations entre la réactivité de surface et des réponses biologiques*. Université Paul Cézanne-Aix-Marseille III.
- Birks, L. S., Friedman, H. (1946). Particle Size Determination from X-Ray Line Broadening. *Journal of applied physics*, 17(8), 687-692.
- Bordet, P. (2008). *Étude de la structure locale par la fonction de distribution de paires*. Paper presented at the Collection de la Société Française de la Neutronique.
- Davison, W., Zhang, H. (1994). In situ speciation measurements of trace components in natural waters using thin-film gels. *Nature*, 367(6463), 546.
- Egami, T., Billinge, S. (2012). *Underneath the Bragg Peaks, Structural Analysis of Complex Materials* (T. Egami & S. Billinge Eds. 2 ed. Vol. 16): Elsevier.
- Farrow, C., Juhas, P., Liu, J., Bryndin, D., Božin, E., Bloch, J., Proffen, T., Billinge, S. (2007). PDFfit2 and PDFgui: computer programs for studying nanostructure in crystals. *Journal of Physics: Condensed Matter*, 19(33), 335219.
- Green, V. S., Stott, D. E., Diack, M. (2006). Assay for fluorescein diacetate hydrolytic activity: optimization for soil samples. *Soil biology and biochemistry*, 38(4), 693-701.
- Hammersley, A. P., Svensson, S. O., Hanfland, M., Fitch, A. N., Hausermann, D. (1996). Two-dimensional detector software: From real detector to idealised image or two-theta scan. *High Pressure Research*, 14(4-6), 235-248.
- Hooda, P., Zhang, H., Davison, W., Edwards, A. (1999). Measuring bioavailable trace metals by diffusive gradients in thin films (DGT): soil moisture effects on its performance in soils. *European Journal of Soil Science*, 50(2), 285-294.
- Juhás, P., Davis, T., Farrow, C. L., Billinge, S. J. (2013). PDFgetX3: a rapid and highly automatable program for processing powder diffraction data into total scattering pair distribution functions. *Journal of Applied Crystallography*, 46(2), 560-566.
- Pham, A. L.-T., Johnson, C., Manley, D., Hsu-Kim, H. (2015). Influence of Sulfide Nanoparticles on Dissolved Mercury and Zinc Quantification by Diffusive Gradient in Thin-Film Passive Samplers. *Environmental science & technology*, 49(21), 12897-12903.
- Pouran, H. M., Martin, F. L., Zhang, H. (2014). Measurement of ZnO nanoparticles using diffusive gradients in thin films: Binding and diffusional characteristics. *Analytical chemistry*, 86(12), 5906-5913.
- Ravel, B., Newville, M. (2005). ATHENA, ARTEMIS, HEPHAESTUS: data analysis for X-ray absorption spectroscopy using IFEFFIT. *Journal of synchrotron radiation*, 12(4), 537-541.
- Sekine, R., Brunetti, G., Donner, E., Khaksar, M., Vasilev, K., Jämting, Å., Scheckel, K., Kappen, P., Zhang, H., Lombi, E. (2014). Speciation and lability of Ag-, AgCl-, and Ag<sub>2</sub>S-nanoparticles in soil determined by X-ray absorption spectroscopy and diffusive gradients in thin films. *Environmental science & technology*, 49(2), 897-905.
- Smith, S. M., Martell, A. E. (2004). Critically selected stability constants of metal complexes database. *Standard reference database 46, version 8.0, NIST, Gaithersburg*.
- T. Degen, T., Sadki, M., Bron, E., König, U., Nénert, G. (2014). The HighScore suite, Powder Diffraction. 29(Supplement S2).

- Van Der Veeke, P. L., Pinheiro, J. P., Van Leeuwen, H. P. (2008). Metal speciation by DGT/DET in colloidal complex systems. *Environmental science & technology*, 42(23), 8835-8840.
- Zhang, H., Davison, W., Knight, B., McGrath, S. (1998). In situ measurements of solution concentrations and fluxes of trace metals in soils using DGT. *Environmental science & technology*, 32(5), 704-710.

# Liste des figures

## Chapitre 1

Figure 1 : au premier plan, tas de compost en première phase de compostage, la fumée illustre la forte chaleur dans le tas de compost. En arrière-plan, compost en andain en phase de maturation, et engin utilisé pour retourner les andains. Photo prise sur la plateforme de compostage de Berneuil dans l'agglomération de Limoges. ....	25
Figure 2 : schéma des étapes de la méthanisation adapté de Moletta (2008) .....	26
Figure 3 : Apport en zinc, plomb, cuivre et cadmium sur les sols agricoles en France, Royaume-Uni, Suisse, Pays-Bas, Chine et Allemagne d'après Belon et al. (2012).....	28
Figure 4 : Implication des éléments traces métalliques suite à l'épandage d'effluents d'élevage dans le monde en 2013 pour (a) la toxicité humaine (effets cancérogènes), (b) la toxicité humaine (effets non cancérogènes), (c) l'écotoxicité des eaux de rivières. Figure extraite de Leclerc et Laurent (2017).....	35
Figure 5 : représentation de $-\Delta G_b$ , de $\Delta G_s$ en fonction du rayon du noyau, de l'enthalpie libre totale de nucléation en fonction du rayon du noyau, Le maximum d'enthalpie libre totale ( $\Delta G_n$ ) correspond au rayon du noyau critique (De Yoreo et Vekilov, 2003).....	45
Figure 6 : Représentation de la surface d'un cristal et des sites de croissance, (De Yoreo et Vekilov, 2003) .....	46
Figure 7 : Structure des clusters (a) $Zn_6S_6(H_2O)_9$ et (b) $Zn_4S_6(H_2O)_4^{4-}$ , les sphères noires et grises représentent respectivement les atomes d'oxygène et de soufre ; les grandes sphères blanches représentent les atomes de zinc et les petites sphères blanches représentent les atomes d'hydrogène, (Luther III et al., 1999) .....	47
Figure 8 : Nanocristal désordonné caractérisé par MET avec des séquences d'empilement variant entre cubique (ABC, sphalérite) et hexagonale (BC, wurtzite)(Moreau et al., 2004). ....	48
Figure 9 : Image de microscopie électronique à transmission de nano-ZnS biogéniques qui montre des défauts cristallins de type macles dans l'encadré jaune, (Xu et al., 2016).....	50
Figure 10 : Pourcentage d'atomes de surface en fonction de la taille de clusters de palladium (Nützenadel et al., 2000).....	55
Figure 11 : Courbe théorique de la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille d'après l'équation établie par Jiang et al. (2001) et les données thermodynamiques correspondant aux ZnS d'après Li et al. (2008) .....	57

Figure 12 : Images de microscopie électronique à transmission de nano-ZnS biogéniques après 24 heures de dissolution. La morphologie de départ des nano-ZnS et la direction de la dissolution sont indiquées par les pointillés et flèches blanches. (Xu et al., 2016) .....59

## Chapitre 2

Figure 1: (a) Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy (EXAFS) spectra and (b) respective Fourier transforms (FT) of raw and treated OWs at different steps of the treatment at the Agri-1 site. Nano-ZnS and Zn-FeOx reference compounds have been added for EXAFS comparison. ....87

Figure 2: Zn speciation determined from the linear combination fitting of the Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy data for all raw and treated OWs. ....89

Figure 3: Percentage of nano-ZnS determined by linear combination fitting of the Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy data as a function of dry matter (DM) content for all raw and treated OWs (except for the pellets from Urban-2 as the treatment consisting of drying, liming and pressing is specific). ....90

Figure 4: Comparison of Zn K-edge extended X-ray absorption fine-structure spectroscopy spectra of Agri-1 digestate, synthesized nano-ZnS and commercial ZnS.....92

## Chapitre 3

Figure 1 : Images MET des particules nano-ZnS avec les rapports molaires S/Zn (a) 4, (b) 1.1, (c) 0.9 (image en champ sombre, diaphragme de contraste) de la série 1 ..... 127

Figure 2 : Taille des cristallites déterminée par la formule de Scherrer selon l'orientation 220 (gris) et taille MET (rouge) des nano-ZnS en fonction du rapport molaire S/Zn ..... 129

Figure 3 : Résultats de la modélisation ab-initio des signaux EXAFS des différentes nano-ZnS synthétisées et commerciale. (a) signaux EXAFS au seuil K du zinc expérimentaux (en noir) et modélisés (en rouge pointillé), (b) nombre moyen de voisins Zn1 et (c) facteur Debye Waller pour chaque échantillon..... 130

Figure 4 : Coordination locale du Zn dans la structure de la sphalérite avec les atomes de zinc en violet et les atomes de soufre en jaune. L'atome de Zn central est dans une configuration tétraédrique (lié à 4 atomes de S) et est entouré par 12 voisins Zn dans la deuxième sphère de coordination..... 131

Figure 5 : Nombre moyen de voisins Zn1 théorique (en noir) et expérimental (en rouge) en fonction de la taille DRX du cluster ..... 132

Figure 6 : Taille des nano-ZnS de la série 2 déterminée par DRX (taille mini en bleu), par modélisation de la PDF (taille moyenne en noir), par la fin des oscillations de la PDF (taille maxi en rouge) en fonction du rapport S/Zn ..... 133

Figure 7 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des nano-ZnS. Les points bleus représentent les points expérimentaux, la courbe rouge est la courbe théorique et la courbe en rouge pointillés représente la courbe théorique décalée en x et y sur laquelle les points expérimentaux s'alignent. Les lettres  $\alpha$ ,  $\beta$ ,  $\gamma$ ,  $\delta$  représentent les groupes définis par la

comparaison multiple des valeurs de contraction du réseau cristallin, les points qui ont des lettres différentes ont des valeurs significativement différentes. ....	134
Figure 8 : courbes théorique de la contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des ZnS. Rouge, trait plein : courbe théorique ; Rouge, traits discontinu : courbe théorique décalé en x et y correspondant à la tendance des nano-ZnS nues .....	136
Figure 9 : a) Fonction PDF correspondant à la nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-ser et nano-ZnS-cys avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir), R est le facteur résiduel b) Diffractogrammes des nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-ser, nano-ZnS-acé, nano-ZnS-hist et nano-ZnS-cys ( $\lambda = 0.2114 \text{ \AA}$ ). c) Tailles des nano-ZnS selon la modélisation de la PDF .....	137
Figure 10 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille modélisée par la fonction PDF pour les nano-nues et nano-ZnS-témoin, -ser, -cys, -hist, -acé .....	139
Figure 11 : Diffractogrammes des nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH - $\lambda = 0.2114 \text{ \AA}$ .....	141
Figure 12 : Fonction PDF correspondant à la nano-ZnS-témoin, nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir). Les flèches correspondent à la fin des oscillations déterminée visuellement. ....	142
Figure 13 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille des nano-ZnS nues, nano-ZnS avec MO et nano-ZnS avec MO thiolée. ....	143
Figure 14 : Contraction en fonction de la taille des nano-ZnS, nano-ZnS avec MO et nano-ZnS avec MO thiolée et les nano-ZnS de l'expérience in-situ.....	144
Figure 15 : Taille des nano-ZnS en fonction du rapport molaire Cystéine/Zn.....	145
Figure 16 : Contraction du réseau cristallin en fonction de la taille de l'ensemble des nano-ZnS des séries 2, 3 et 4.....	146
Figure 17 : conformation de la cystéine à la surface de ZnS (atomes de soufre en jaune et atomes de zinc en gris). Image issue de Nawrocki et Cieplak (2014) .....	147
Figure 18 : a) variation d'enthalpie libre correspondant au bulk ( $-\Delta G_B$ en pointillés) et à la surface ( $\Delta G_s$ en noir et $\Delta G_s'$ en rouge) en considérant les énergies libres $\sigma$ et $\sigma'$ avec $\sigma' < \sigma$ . b) Somme des deux termes $\Delta G$ (noir) et $\Delta G'$ (rouge) considérant $\sigma$ et $\sigma'$ et représentation du rayon du noyau critique r. ....	148
Figure 19 : Représentation du recouvrement de la surface des nano-ZnS par la cystéine et le glutathion.....	149
Figure 20 : Images de microscopie électronique à transmission pour la « Grande nano-ZnS » à gauche et la « Petite nano-ZnS » à droite.....	152
Figure 21 : Images de microscopie en mode STEM – HAADF pour la « Grande nano-ZnS » à gauche et la « Petite nano-ZnS » à droite.....	153
Figure 22 : Diffractogramme de rayons X de chaque particule de ZnS .....	154
Figure 23 : Fonction PDF correspondant à la micro-ZnS, la Grande nano-ZnS et la petite nano-ZnS avec la modélisation de la fonction PDF (pointillé noir) et le résidu de la modélisation (noir). R est le facteur résiduel de la modélisation.....	155
Figure 24 : Pourcentage de dissolution des 3 particules en fonction du temps .....	157
Figure 25 : quantité de Zn issu de la dissolution des particules par unité de surface en fonction du temps.....	157

Figure 26 : quantité de zinc issu de la dissolution de la micro-ZnS par unité de surface en fonction du temps .....	158
---	-----

## Chapitre 4

### Partie 1

Figure 1 : Diffractogramme de la nano- <sup>68</sup> ZnS.....	178
Figure 2 : diffractogrammes (a) du Nitisol, (b) de l'Arénosol (X Pert Pro, $\lambda=1.789\text{\AA}$ ) .....	180
Figure 3 : Quantité de fluorescéine produite (mg/kg sol) illustrant l'activité bactérienne totale du sol dans (a) le Nitisol + NP ou Nitisol témoin et dans (b) l'arénosol + NP ou l'Arénosol témoin. Les barres d'erreur correspondent à l'écart-type des valeurs des 4 réplicas. ....	184
Figure 4 : pH mesuré dans la solution de sol du sol du (a) Nitisol + NP ou du Nitisol témoin et de (b) l'Arénosol + NP ou de l'Arénosol témoin. Les barres d'erreur correspondent à l'incertitude sur la mesure de pH (0.1) .....	185
Figure 5 : Comparaison (a) de la fluorescéine produite illustrant l'activité microbienne totale des 2 sols + NP et (b) du pH de la solution de sol dans les 2 sols + NP. La barre d'erreur représente l'écart-type des valeurs des 4 réplicas pour (a) et l'incertitude de mesure du pH (0.1) pour (b). ....	186
Figure 6 : Evolution de concentration en Zn au cours du temps dans la solution pour les 4 différentes conditions .....	187
Figure 7 : Quantité de zinc issu de la dissolution des nano- <sup>68</sup> ZnS accumulée sur la DGT en contact du (a) Nitisol + NP et du Nitisol témoin, de (b) l'Arénosol + NP et de l'Arénosol témoin .....	188
Figure 8 : Quantité de zinc issu de la dissolution des nano- <sup>68</sup> ZnS accumulée sur la DGT en contact (a) des deux sols + NP pour comparaison (b) des deux sols sur les 6 premiers jours d'incubation .....	188
Figure 9 : Quantité de Zn naturel labile accumulé sur la DGT dans les deux sols témoins....	190

### Partie 2

Figure 1 : Zn concentration within the 0–5 cm layer of the control and amended soils, as influenced by the amount of Zn added to the soil via PS (adapted from Mallmann, 2013 and Formentini et al., 2015). ....	205
Figure 2 : (a, b) Scanning electron microscopy micrograph of the 20–0.2 $\mu\text{m}$ PS fraction; arrows indicate regions selected for energy dispersive X-ray spectroscopy (c). ....	206
Figure 3 : (a) $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the PS sample compared to bulk and nano-sized ZnS; (b) 1-component LCF for the PS sample. ....	207
Figure 4 : X-ray diffractogram of the studied soil ( $\lambda=1.79\text{\AA}$ ). ....	208
Figure 5 : $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the control and amended soils as compared to the selected references. ....	210
Figure 6 : $k^2$ -weighted Zn K-edge EXAFS and FT spectra of the control and amended soils, and the optimal LCF for each sample.....	211



Figure 7 : (a) Zn speciation within the control and amended soils and the PS; and (b) the resulting exogenous Zn distribution. ....	212
---	-----

## Chapitre 6

Figure 1 : dispositif expérimental pour l'expérience de dissolution des nano-ZnS .....	245
Figure 2 : microscopies de sol et enceinte thermostatée.....	246
Figure 3 : schéma décrivant le dispositif DGT (Diffusive Gradient in Thin Film). Issu de Zhang et al. (1998) .....	247
Figure 4 : Représentation schématisée de la concentration en espèce ionique dans l'assemblage de la DGT en contact avec de l'eau dans laquelle la concentration est $C_b$ (BDL = Diffusive Boundary Layer, la couche de diffusion à l'interface de la solution et du gel de diffusion de la DGT). Schéma issu de Davison et Zhang (1994) .....	248
Figure 5 : réaction d'hydrolyse de la fluorescéine diacétate.....	249
Figure 6 : Comparaison de diffractogrammes d'une nano-ZnS synthétisée (en haut) et d'une nano-ZnS commerciale (en bas).....	252
Figure 7 : Spectre d'absorption des rayons X au seuil du Zinc .....	254
Figure 8 : Schéma simplifié d'une ligne de lumière dédiée à l'absorption des rayons X, exemple du montage de la ligne FAME à l'ESRF ( <a href="http://www.esrf.fr">www.esrf.fr</a> et <a href="http://www.synchrotron-soleil.fr">www.synchrotron-soleil.fr</a> ).....	256
Figure 9 : Organigramme de la procédure d'affinement d'un spectre XAS, d'après Auffan (2007).....	258
Figure 10 : Comparaison de deux fonctions PDF extraites sur deux intervalles de $Q$ différents : $[0;7]$ et $[0;14] \text{ \AA}^{-1}$ pour les courbes bleues et oranges respectivement.....	261
Figure 11 : Traitement du signal de diffusion totale des rayons X sur fit2D.....	262
Figure 12 : Signal d'intensité de diffusion des rayons X en fonction de $Q$ pour l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2) .....	263
Figure 13 : Fonction $S(Q)$ de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2) .....	264
Figure 14 : Fonction $F(Q)$ de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2) .....	264
Figure 15 : Fonction PDF de l'échantillon nano-ZnS S/Zn 0.9 (série 2).....	264



# Liste des tableaux

## Chapitre 1

Tableau 1 : Comparaison des concentrations en zinc dans les différents effluents d'élevage indiquées dans la littérature.....	29
Tableau 2 : Critères mis en place pour l'épandage, la mise sur le marché ou la normalisation de certains PRO.....	31
Tableau 3 : Concentration en Zn ayant un effet sur la croissance de pois et de trèfle blanc d'après l'étude de terrain de Chaudri et al. (2000).....	34
Tableau 4 : Concentrations en 3 éléments pour lesquelles des effets toxiques sont observés sur le pois dans l'étude de Kopittke et al. (2014).....	34
Tableau 5 : Spéciation du Zn dans les PRO selon leur type et le traitement subi, données extraites de différentes études ; 1 : (Kim et al., 2014) ; 2 : (Legros et al., 2017) ; 3 : (Ma et al., 2014) ; 4 : (Lombi et al., 2012) ; 5 : (Donner et al., 2011) ; 6 : (Donner et al., 2013) .....	40
Tableau 6 : Structures et constantes de stabilité des complexes Zn avec certains acides aminés, (Smith et Martell, 2004 ) .....	52

## Chapitre 2

Table 1 : Description of the treatment plants .....	81
Table 2 : Characteristics of raw and treated OWs (DM= dry matter, ORP=oxidation reduction potential, Corg=organic carbon). The concentrations of all the elements are expressed on a dry matter (DM) basis. Values are given +/- 15% for [Zn], [P] and [Fe], +/- 7% for [Corg], +/- 20 mV for ORP, +/- 0.1 for pH and +/- 0.2% for DM).....	85

## Chapitre 3

Tableau 1 : résumé des paramètres de synthèse des nano-ZnS .....	120
Tableau 2 : Nomenclature des échantillons de nano-ZnS synthétisées en présence de molécules organiques et la structure des molécules organiques.....	121
Tableau 3 : Méthodes de caractérisation utilisées pour chaque série de nano-ZnS .....	122
Tableau 4 : Pas de temps et temps d'acquisition définis pour l'acquisition des spectres EXAFS .....	124

Tableau 5 : tailles estimées après caractérisation par MET .....	128
Tableau 6 : Résumé de l'influence de chacun des groupements fonctionnels sur la taille et la contraction du réseau cristallin des nano-ZnS .....	140
Tableau 7 : Tailles DRX et PDF pour les nano-ZnS-cys et nano-ZnS-GSH. Les valeurs +/- correspondent à l'écart type entre 3 valeurs .....	143
Tableau 8 : Résultats des calculs de recouvrement de la surface des nano-ZnS par les molécules de cystéine.....	146
Tableau 9 : Détermination de la taille des nano-ZnS de la série 5 d'après les images MET..	153
Tableau 10 : Bilan des résultats de caractérisation de taille et de surface spécifique des 3 particules de ZnS utilisées pour la mesure de cinétique de dissolution.....	156

## Chapitre 4

Tableau 1 : Caractéristiques de la synthèse de nano- <sup>68</sup> ZnS .....	177
Tableau 2 : Caractéristiques des deux sols choisis.....	179
Tableau 3 : Caractéristiques des sols.....	181
Tableau 4 : masse de Zn du traceur et la masse de Zn naturel + Zn du traceur accumulées sur la DGT au dernier jour de l'incubation et la proportion de Zn provenant du traceur par rapport au Zn labile total au dernier jour d'incubation.....	193

## Chapitre 6

Tableau 1 : formule, log K et pKa des groupements fonctionnels de chaque molécule organique utilisée pour les synthèses .....	241
Tableau 2 : Abondances des isotopes stables du Zn .....	242
Tableau 3 : Utilisation des matériaux dans la thèse .....	244
Tableau 4 : Lignes de lumière utilisées.....	257
Tableau 5 : Abondance de chaque isotope stable du Zn dans le Zn naturel, le Zn du traceur en théorie et le Zn du traceur d'après la mesure .....	268
Tableau 6 : Erreur déterminée sur les mélanges de Zn naturel et de Zn traceur .....	270



## **Devenir du zinc des produits résiduels organiques après méthanisation et recyclage agricole : rôle des nanoparticules de sulfure de zinc**

Le recyclage agricole de Produits Résiduels Organiques (PRO) bruts ou après un traitement tel que la méthanisation et/ou le compostage est une pratique répandue. Il est indispensable d'évaluer l'impact environnemental de l'épandage des PRO après méthanisation, technologie en essor, en particulier vis-à-vis du zinc (Zn). La spéciation du Zn dans le PRO est un paramètre crucial pour établir le risque. Nous avons pu mettre en évidence que la méthanisation favorise la formation de nanoparticules de sulfures de Zn (nano-ZnS), qui est donc la forme majoritaire du Zn dans les digestats de méthanisation (>70%). Cette forme du Zn est instable car elle se transforme lors du compostage des digestats. Les paramètres structuraux des nano-cristaux (taille, contrainte) peuvent expliquer leur réactivité. Nos résultats montrent que plus les nano-ZnS sont petites et plus leur contrainte est importante. De plus, l'interaction avec les groupements thiols de certaines molécules organiques, potentiellement présentes dans un digesteur de méthanisation, relâche la contrainte des nano-ZnS et contrôle leur croissance. Enfin, les caractéristiques du sol amendé ont un rôle majeur pour le devenir des nano-ZnS: les composants de sols argileux riches en oxydes de fer sont capables de retenir le Zn issu de la dissolution des nano-ZnS, contrairement à ceux d'un sol sableux. Ce travail apporte une meilleure compréhension de la dynamique du Zn dans les écosystèmes cultivés soumis à l'épandage de PRO.

Mots-clés : spéciation, impact environnemental, sol, digestats, composts, réactivité, spectroscopie d'absorption des rayons X, structure à l'échelle nanométrique

### **Fate of zinc in organic waste after anaerobic digestion and agricultural recycling: role of nanosized zinc sulfide**

Agricultural recycling of organic waste (OW), raw or after a treatment like anaerobic digestion (AD) and/or composting is common. It is necessary to assess the environmental impact of OW agricultural recycling after anaerobic digestion since this technology is gaining interest, particularly regarding zinc, an abundant element in OW. In order to properly evaluate the risk, zinc speciation must be known. First, we have shown that AD promote the formation of nano-ZnS that is therefore the main species of Zn (> 70%) in AD digestates. This unstable species is transformed during composting of 1 to 3 months. Size and strain are parameters that can explain nanocrystals reactivity. We showed that the more nano-ZnS are small and the higher the strain is. Interaction with thiol containing organic molecules, potentially present in anaerobic digesters, release nano-ZnS structural strain and control its growth. Finally, amended soil characteristics have a key role for nano-ZnS fate: the components of clayey and iron-oxide-rich soils are able to immobilize Zn released by nano-ZnS dissolution, unlike sandy soils components. This work gives a better understanding of zinc dynamics in cultivated ecosystems subject to spreading of organic waste.

Key words: speciation, environmental impact, soil, digestats, composts, reactivity, X-ray absorption spectroscopy, nanometer scale structure

